



Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"
Unidad Académica de Ciencias Biológicas



CITRULINACIÓN ENDÓGENA Y HOMÓLOGOS DE
PADs/ADs EN MIEMBROS DE LA MICROBIOTA
HUMANAY ANTICUERPOS ANTI-ZONULINA DE
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BÁSICAS
(Orientación en Ciencias Biológicas)

PRESENTA

M. en C. María Elena Pérez Pérez

DIRECTORES DE TESIS

Dr. en C. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa
Director

Dra. en C. Lucía Delgadillo Ruíz
Co-Directora

Zacatecas, México

Noviembre de 2024

Índice general

I.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	II
III.	LISTADO DE ABREVIATURAS.....	III
IV.	RESUMEN.....	VII
V.	ABSTRACT.....	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN		1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....		3
2.1.	Microbiota Humana (MH)	3
2.2.	Microbiota Intestinal (MI)	4
2.2.1.	Técnicas empleadas para estudiar la MI.....	6
2.2.2.	Funciones de la MI y factores que influyen en su composición	7
2.3.	Sistema Inmunitario (SI).....	10
2.3.1.	Sistema Inmune de Mucosas (SIM)	10
2.4.	Barrera Epitelial Intestinal (BEI) y Uniones Celulares	15
2.4.1	Uniones Estrechas (TJ).....	15
2.5.	Disbiosis Intestinal (DI).....	19
2.6.	Alteraciones en la Integridad de la BEI.....	20
2.6.1.	Mecanismos de ataque al Complejo TJ por Bacterias	21
2.7.	Translocación Microbiana (TM)	22
2.8.	Influencia del Microbioma en Autoinmunidad	23
2.8.1.	Mecanismos de la Inmunidad Innata.....	24
2.8.1.	Mecanismos de la Inmunidad Adaptativa	25
2.9.	Artritis Reumatoide (AR)	26
2.9.1.	Manifestaciones Clínicas.....	26
2.9.2.	Etiología y Fisiopatología de la AR.....	27
2.9.3.	Diagnóstico y Tratamiento de la AR	32
2.9.4.	Implicaciones del Microbioma Humano en AR	34
2.10.	Homólogos de PADs/ADs (Hs-PADs/ADs).....	35
2.11.	Vía de señalización NOS/NO y Citrulinación microbiana	36
CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN		37
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS		38
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS		39
5.1.	Objetivo General	39
5.2.	Objetivos Particulares.....	39
CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS		40
6.1.	Diseño de investigación	41

6.1.1. Tipo de Estudio.....	40
6.1.2. Población y Muestra.....	40
6.1.3. Criterios de Inclusión.....	40
6.1.4. Criterios de Exclusión	40
6.1.5. Material Biológico.....	41
6.2. Preparación de medios de cultivo.....	41
6.2.1. Agar Sangre.	41
6.2.2. Agar Biggy.	42
6.2.3. Agar Manitol Salado.	42
6.2.4. Agar Macconkey.	42
6.2.5. Medio Stuart.	42
6.3. Aislamiento de Especies microbianas según su origen	42
6.3.1. Aislados Clínicos.	42
6.3.2. Aislados Alimentarios.	43
6.4. Identificación de Especies Microbianas	43
6.5. Cultivos Microbianos.....	44
6.6. Resiembras y conservación de microorganismos.....	45
6.7. Extracción de proteínas microbianas	46
6.7.1. Extracción de proteínas Bacterianas.	46
6.7.2. Extracción de proteínas Micóticas.	46
6.8. Cuantificación De Proteínas Microbianas	47
6.9. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	47
6.10. Transferencia De Proteínas Microbianas	48
6.11. Detección de Hs-PADs/ADs por Western blot (WB).....	49
6.12. Detección de Antígenos Citrulinados (AgCIT) microbianos por WB.....	49
6.13. Determinación de Biomarcadores de AR	50
6.13.1. Determinación de Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)	50
6.13.2. Determinación de Factor Reumatoide (FR)	50
6.13.3 Determinación de Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs) por ELISA	50
6.14. Reactividad antimicrobiana de Sueros AR y Controles por WB	51
6.15. Obtención de ACPAs de afinidad por Elución.....	51
6.16. Reactividad de ACPAs en extractos microbianos por WB.....	51
6.17. Actividad de citrulinación en cultivos microbianos	52
6.18. Determinación de Anticuerpos anti-Zonulina por ELISA	52
6.19. Análisis de imágenes	53
6.20. Procesamiento de la información	53
6.21. Análisis Estadístico.....	53
CAPÍTULO 7. RESULTADOS	54
7.1. Los extractos microbianos muestran concentraciones de proteínas variadas	54
7.2. Las especies microbianas presentan perfiles antigénicos diferidos.....	55

7.3. Las Proteínas microbianas se transfieren de forma homogénea.	58
7.4. Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PAD2.	59
7.5. Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota Albergan Hs-PAD4.	60
7.6. Citrulinomas microbianos están presentes en Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota.	62
7.7. La expresión de AgCIT se asocia con la expresión de Hs-PAD2 y PAD4 en Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota.	65
7.8. Especies patógenas citrulinan Ags por Hs-PAD2/PAD4.	67
7.9. Especies patógenas de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota, presentan actividad de citrulinación por la vía NOS/NO.	69
7.10. Los pacientes con AR presentaron biomarcadores positivos.	70
7.11. La reactividad antimicrobiana se incrementa en AR y el Isotipo IgG es mayormente reactivo.	71
7.12. Los ACPAs de afinidad reconocen AgCIT.	73
7.13. Los pacientes con AR presentan niveles elevados de Anticuerpos anti-Zonulina .	75
CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN.	76
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES	84
CAPÍTULO 10. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DE LA TESIS.	85
CAPÍTULO 11. PERSPECTIVAS	86
CAPÍTULO 12. PROPUESTA	87
CAPÍTULO 13. BIBLIOGRAFÍA	88
CAPÍTULO 14. ANEXOS	114

I. Índice de Figuras

Figura 2.1: Ubicación de la microbiota humana en diversas regiones anatómicas.....	3
Figura 2.2: Factores ambientales que determinan el desarrollo de la MI y el SI.....	9
Figura 2.3: Sistema inmune de mucosas.....	11
Figura 2.4: Composición celular de un folículo de PP humanas.....	14
Figura 2.5: TJ en células epiteliales intestinales.....	16
Figura 2.6: Modulación del complejo TJ por Zonulina.....	18
Figura 2.7: Disbiosis y alteraciones en la PI.....	20
Figura 2.8: Mecanismo químico de la citrulinación de proteínas.....	27
Figura 2.9: Citrulinación de proteínas celulares y de matriz extracelular.....	29
Figura 2.10: Fisiopatología de la Artritis Reumatoide.....	30
Figura 2.11: Esquema de la vía de las Arginina Deaminasas.....	36
Figura 7.1: SDS-PAGE. Perfiles antígenicos microbianos.....	56
Figura 7.2: Transferencia de proteínas microbianas.....	59
Figura 7.3: Hs-PAD2 presentes en miembros de la microbiota.....	60
Figura 7.4: Comparación de la expresión de Hs-PAD2 en filas microbianas.....	61
Figura 7.5: Hs-PAD4 presentes en miembros de la microbiota.....	62
Figura 7.6: Comparación de la expresión de Hs-PAD4 en filas microbianas.....	63
Figura 7.7: Citrulinación de Ags en miembros de la microbiota.....	64
Figura 7.8: Comparación de la expresión de AgCIT en filas microbianas.....	65
Figura 7.9: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Proteobacteria.....	66
Figura 7.10: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Firmicutes.....	67
Figura 7.11: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Ascomycota.....	67
Figura 7.12: Porcentaje de expresión de AgCIT, Hs-PAD2 y Hs-PAD4 por especie.....	68
Figura 7.13: Determinación de la actividad de citrulinación en cultivos microbianos.....	70
Figura 7.14: Diferencias en la reactividad anti-microbiana de sueros AR y controles.....	73
Figura 7.15: Isotipo de Igs reactivas a Ags microbianos en casos (AR) y controles.....	74
Figura 7.16: Reactividad coincidente entre ACPAs de afinidad vs pAb anti-citrulina.....	75
Figura 7.17: Diferencias en los niveles de AbsZON en casos (AR) y controles.....	76
Figura 14.1: Curva ROC.....	123

II. Índice de Tablas

Tabla 2.1. Principales proteínas del complejo TJ, blancos de patógenos.	22
Tabla 2.2. Criterios de clasificación del ACR/EULAR.	33
Tabla 4.1. Operacionalización de variables.	39
Table 6.1. Cepas microbianas empleadas en el estudio.	46
Tabla 6.2. Preparación de gel de poliacrilamida al 10%.	49
Tabla 7.1. Concentraciones de proteínas microbianas.	55
Tabla 7.2. Estimación del peso molecular de proteínas en Proteobacteria.	57
Tabla 7.3. Estimación del peso molecular de proteínas en Firmicutes.	57
Tabla 7.4. Estimación del peso molecular de proteínas en Ascomycota.	58
Tabla 7.5. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Proteobacteria.	69
Tabla 7.6. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Firmicutes.	69
Tabla 7.7. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Ascomycota.	69
Tabla 7.8. Asociaciones de AgCIT vs Actividad de citrulinación en especies.	71
Tabla 7.9. Datos clínicos de pacientes con AR.	72
Tabla 7.10. Asociaciones de Abs antimicrobianos en pacientes con AR.	74
Tabla 7.11. Tabla de contingencia para la exposición de AbsZON.	76
Tabla 7.12. Frecuencias de AbsZON en casos y controles, y Razón de Momios (RM).	77
Tabla 7.13. Interpretación de los resultados.	77
Tabla 7.14. Asociaciones de AbsZON y biomarcadores serológicos de AR.	77
Tabla 14.1. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en píxeles (px).	118
Tabla 14.2. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en unidades (U). ...	119
Tabla 14.3. Reactividad de Abs anti-microbianos de los grupos de estudio.	120
Tabla 14.4. Concentraciones de AbsZON conocidas para curva de calibración.	120
Tabla 14.5. Concentraciones de AbsZON en los casos (AR).	121
Tabla 14.6. Concentraciones de AbsZON en los controles.	121
Tabla 14.7. Valor de corte calculado en curva ROC.	122
Tabla 14.8. Área bajo la curva ROC.	123

III. Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
EAI	Enfermedades autoinmunes
AR	Artritis Reumatoide
PADs	Peptidil Arginina Deiminasas
ACPAs	Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (Del inglés: Anti-Citrullinated Protein Antibodies)
ADs	Arginina Deiminasas
TM	Translocación microbiana
PI	Perbeabilidad intestinal
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pPAD	PAD de <i>P. gingivalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CONAHCyT	Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías
GI	Gastrointestinal
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
SI	Sistema inmune
SIM	Sistema inmune de mucosas
CD	Células dendríticas
CLI	Células linfoides innatas
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LT	Linfocitos T
MUC	Mucinas
PAM	Péptidos antimicrobianos
IgAs	Inmunoglobulina secretora tipo A
LP	Lámina propia
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
LPS	Lipopolisacárido
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (Del inglés: gut-associated lymphoid tissue)
PP	Placas de Peyer
FLA	Folículos linfoides aislados
EAF	Epitelio asociado al folículo
CSE	Cúpula subepitelial
CG	Centros germinales
ZM	Zona marginal
Tmc	Células T de memoria central
Treg	Células T reguladoras
Tfh	Células T foliculares auxiliares
BEI	Barrera epitelial intestinal
BVI	Barrera vascular intestinal
BLI	Barrera linfática intestinal

JAM	Proteínas de adhesión (Del inglés: junction adhesion molecules)
ZO	Zonula Occludens
PDZ	Acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas; PSD95, DigA y ZO-1
CXCR3	Receptor de quimiocina CXC tipo 3
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Del inglés: epidermal growth factor)
PAR2	Receptor activado por proteinasa 2 (Del inglés: proteinase activated receptor 2)
MAP-cinasa	Proteína cinasa activada por mitógeno (Del inglés: Mitogen-Activated Protein kinases)
PPI	Fosfatidil inositol (Del inglés: phosphatidyl inositol)
TJ	Uniones estrechas (Del inglés: tight junctions)
AJ	Uniones adherentes (Del inglés: Adherent junctions)
DAG	Diaglicerol
IP-3	Inositol trifosfato
PKC	Proteína cinasa tipo C (Del inglés: Protein kinase C)
MyD88	Diferenciación mielóide 88 (Del inglés: Myeloid differentiation)
IL	Interleucina
ECEA	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotexigenica
NOD1	Dominio 1 de oligomerización de nucleótidos (Del inglés: nucleotide oligomerization domain 1)
TLR	Receptores tipo toll (Del inglés: Toll-like receptor)
NK	Células asesinas naturales (Del inglés: Natural killer)
p-STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Del inglés: signal transducer and activator transcription 3)
p-TYK2	Tirosina cinasa 2
NCR	Receptor de citotoxicidad natural (Del inglés: Natural cytotoxicity receptor)
NKi	Células NK invariantes
CPA	Células presentadoras de antígenos
Abs	Anticuerpos (Del inglés: Antibodies)
B reg	Células B reguladoras
CP	Células plasmáticas
FR	Factor reumatoide
CII	Colágeno tipo II
TNF	Factor de necrosis tumoral (Del inglés: Tumor necrosis factor)
MPM	Metalproteinasas de matriz
FLS	Fibroblastos similares a sinoviocitos (Del inglés: Fibroblast-Like Synoviocytes)
MEC	Matriz extracelular
AuAbs	Autoanticuerpos (Del inglés: Autoantibodies)
Fc	Factor cristalizante
IgG	Inmunoglobulina tipo G

IgM	Inmunoglobulina tipo M
HLA	Antígeno leucocitario humano (Del inglés: Human leukocyte antigen)
Th	Células T auxiliares (Del inglés: T helper)
EULAR	Liga Europea contra el Reumatismo (Del inglés: European League against Rheumatism)
ACR	Colegio Americano de Reumatología (Del inglés: American College of Rheumatology)
DAS-28	Puntuación de actividad de la enfermedad (Del inglés: Disease Activity Score)
SDAI	Índice de actividad de enfermedad simplificado (Del inglés: Simplified Disease Activity Index)
AINE	Fármacos antiinflamatorios no esteroides
FAME	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
FAMEsc	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales
FAMEsd	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos dirigidos
FAMEb	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos
<i>P. copri</i>	<i>Prevotella copri</i>
ATP	Trifosfato de adenosina (Del inglés: Adenosine Triphosphate)
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
NO	Óxido Nítrico (Del inglés: Nitric oxide)
NOS	Óxido Nítrico Sintasa (Del inglés: Nitric oxide synthase)
Hs-PADs	Homólogos de PADs
AgCIT	Antígenos citrulinados
PAD_C	Dominio PAD catalítico
ABS	Absorbancias
VSG	Velocidad de sedimentación globular
WB	Western blot
PBS	Solución salina de fosfatos (Del inglés: Phosphate buffered saline)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Del inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISA-I	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (Del inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay-Indirect)
ELISA-C	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas competitivo (Del inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay-Competitive)
HRP	Peroxidasa de rábano (Del inglés: Horseradish peroxidase)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio (Del inglés: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
pAbs	Anticuerpos policlonales
pH	Puentes de hidrógeno
O ₂	Oxígeno
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (Del inglés: Polymerase chain reaction)

DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Del inglés: Deoxyribonucleic acid)
NGS	Secuenciación de Nueva Generación (Del inglés: Next Generation Sequencing)
SI	Sistema inmune
NF-KB	Factor Nuclear Kappa B (Del inglés: Nuclear Factor KB)
G	Gramos
L	Litro
HGF	Hospital General de Fresnillo
Min	Minutos
AMH	Agar Muller Hinton
MRS	Agar Man Rogosa Sharpe
Tr	Temperatura de referencia
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
BSA	Albúmina sérica bovina (Del inglés: Bovine Serum Albumin)
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
KDa	Kilodalton
Ags	Antígenos

IV. Resumen

Introducción: El Microbioma humano es esencial en diversos procesos fisiológicos, incluida la inmunidad, no obstante, eventos disbióticos y aumento en la permeabilidad intestinal (PI) conducen al desarrollo de enfermedades autoinmunes (EAI) como la Artritis Reumatoide (AR) que origina cambios patogénicos en la membrana sinovial y hueso debido a mecanismos que involucran la producción de Anticuerpos Antiproteínas Citrulinadas (ACPAs), estimulados por péptidos modificados por enzimas Peptidil Arginina Deiminasas (PADs) humanas. **Objetivo:** Evaluar la expresión de enzimas homólogas de PADs (Hs-PADs) o Arginina Deiminasas (ADs) y citrulinomas en miembros de la microbiota humana, y determinar ACPAs microbianos y anticuerpos anti-Zonulina (AbsZON) en pacientes con AR. **Material y Métodos:** Se trata de un estudio de casos y controles no pareado realizado en Guadalupe, Zac., 10 casos confirmados con diagnóstico de AR seropositiva fueron comparados con 10 controles de tipo vecindario. Los métodos empleados fueron cultivos microbianos, Western blot (WB), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto (ELISA-I) y competitivo (ELISA-C), elución y prueba de Óxido Nítrico. Se utilizaron 17 cepas microbianas y anticuerpos policlonales (pAbs) específicos del péptido sintético derivado de los residuos 100-200 de PAD2 humano (pAb anti-PAD2), y del fragmento recombinante de los aminoácidos 326 y 611 de PAD4 humano (pAb anti-PAD4), además de un pAb anti-citrulina humano, ACPAs de afinidad y sueros humanos; el análisis estadístico fue descriptivo e inferencial mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney generadas en los programas SPSS y GraphPad Prism, además de Razón de Momios (RM) y coeficiente de correlación de Spearman (*rs*). **Resultados:** Patógenos de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan homólogos de PADs/ADs (Hs-PADs/ADs) y antígenos citrulinados (AgCIT), que fueron reactivos a ACPAs de pacientes con AR (casos) quienes además presentaron niveles elevados de AbsZON en comparación con los controles y asociación positiva con AR. **Conclusión:** Los citrulinomas microbianos y Hs-PADs/ADs son abundantes en el microbioma humano y podrían estar involucrados en la producción de ACPAs. Los AbsZON sugieren aumento en la PI identifica como posible factor de riesgo en AR. Los presentes hallazgos, podrían representar el vínculo molecular entre la disbiosis, la PI y la patogénesis de AR.

V. Abstract

Introduction: The human microbiome it is essential in various physiological processes, including immunity; however, dysbiotic events and increased intestinal permeability (IP) lead to the development of autoimmune diseases (AID) such as Rheumatoid Arthritis (RA), which causes pathogenic changes in the synovial membrane and bone due to mechanisms that involve the production of Anti-Citrullinated Protein Antibodies (ACPAs), stimulated by peptides modified by human Peptidyl Arginine Deiminases (PADs) enzymes. **Objective:** To evaluate the expression of homologs enzymes of PADs (Hs-PADs) or Arginine Deiminases (ADs) and citrullinomas in members of the human microbiota, and to determine microbial ACPAs and anti-Zonulin antibodies (AbsZON) in patients with RA. **Material and Methods:** This was an unmatched case-control study conducted in Guadalupe, Zac., 10 confirmed cases with a diagnosis of seropositive RA were compared with 10 neighborhood-type controls. The methods used were microbial cultures, Western blot (WB), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) indirect (I) and competitive (C), elution and Nitric Oxide test. We used 17 microbial species and specific polyclonal antibodies (pAbs) of the synthetic peptide derived from residues 100-200 of human PAD2 (anti-PAD2 pAb) and the recombinant fragment of amino acids 326 and 611 of human PAD4 (anti-PAD4 pAb), in addition to an human anti-citrulline pAb, affinity ACPAs and human sera; The statistical analysis was descriptive and inferential using the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests generated in the SPSS and GraphPad Prism programs. In addition to the Odds Ratio (OR) and Spearman correlation coefficient (*rs*). **Results:** Pathogens of Firmicutes, Proteobacteria, and Ascomycota harbor homologs of PADs/ADs and citrullinated antigens (AgCIT), which were reactive to ACPAs of RA patients (cases) who also presented elevated levels of AbsZON compared to controls and a positive association with RA. **Conclusion:** Microbial citrullinomas and Hs-PADs/ADs are extensive in the human microbiome and could be involved in the production of ACPAs. AbsZON suggest increased IP identified as a possible risk factor in RA. The present findings could represent the molecular link between dysbiosis, IP and RA pathogenesis.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El microbioma humano corresponde al conjunto de microorganismos y sus genomas, ubicados en diversas regiones anatómicas, siendo el intestino el mayormente colonizado desde el nacimiento, estos incluyen bacterias, virus, hongos y arqueas [1-4]. En personas sanas, el ~70% de las especies tienen una relación simbiótica con el huésped, pero disminuyen considerablemente dependiendo del estado de salud [5,6]. No obstante, la microbiota subdominante pertenece a especies transitorias que pueden tener potencial patogénico [7]. Las filas microbianas dominantes son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria [8], siendo Ascomycota otro filo que se encuentran en menor medida [9].

El ecosistema microbiano es complejo y puede ser afectado por numerosas variables que alteran el equilibrio de los microorganismos, provocando disbiosis [10,11], una condición que estimula respuestas inmunes locales y sistémicas desreguladas [12,13] mediadas por mecanismos que conducen a la autoinmunidad [14,15] y al desarrollo de enfermedades autoinmunes (EAI) [8,16]. Simultáneamente, la permeabilidad intestinal (PI), translocación microbiana (TM) y mimetismo molecular también están asociados [17,18], no obstante, la genética del huésped es crucial para su desarrollo [19]. En consecuencia, el tejido diana puede estar alejado del intestino, como es el caso de la Artritis Reumatoide.

Esta EAI origina cambios patogénicos en la membrana sinovial y hueso debido a mecanismos que involucran la producción de ACPAs, estimulados por diversos péptidos citrulinados modificados por enzimas PAD2 y PAD4 humanas [20-22], es preciso señalar, que la AR puede originarse en localizaciones mucosas, incluidos el intestino y la cavidad bucal [23]. Dicho esto, se ha considerado que la translocación de enzimas microbianas puede influir en una mayor citrulinación de péptidos a través de mecanismos de filtración y migración a las articulaciones [24], sin embargo, los mecanismos moleculares no han sido dilucidados.

En suma, la capacidad de algunas enzimas bacterianas para modificar péptidos potencialmente artritogénicos se ha documentado clínica y experimentalmente. No obstante, la existencia e implicaciones clínicas sobre homólogos de PADs (Hs-PADs) y citrulinomas microbianos ha sido poco explorada [25-35] y de manera análoga los estudios de PI en pacientes con AR también son escasos. Es factible proponer que algunos miembros de la microbiota humana (MH) poseen la maquinaria catalítica para citrulinar proteínas, promover la generación de ACPAs y contribuir a la ruptura de la tolerancia inmunológica en personas predispuestas, que, de manera simultánea, presenten aumento en la PI y permita la filtración.

Por esta razón, en la presente investigación se estudió la expresión de enzimas Hs-PADs/ADs y citrulinomas microbianos en 17 miembros de la MH pertenecientes a Proteobacteria, Firmicutes y Ascomycota. Al mismo tiempo, se evaluaron Abs anti-microbianos y AbsZON en casos (AR) y controles. Se demostró que algunos patógenos de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan enzimas Hs-PADs/ADs y citrulinomas microbianos, que son reactivos a ACPAs de pacientes con AR; también se comprobó que los pacientes presentan AbsZON elevados en comparación con los controles. Estos hallazgos, podrían representar el vínculo molecular entre los microorganismos de una microbiota disbiótica, la PI y la patogénesis de la AR.

El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Inmunología y Biología Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Campus Guadalupe, de la Universidad Autónoma de Zacatecas, bajo el financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) con número 1084935 y el UAZ CA-5. Autoinmunidad. Esta tesis puede ser citada como: Pérez-Pérez ME., Bollain-y-Goytia JJ. & Delgadillo-Ruiz L. Citrulinación endógena y homólogos de PADs/ADs en miembros de la microbiota humana y anticuerpos anti-Zonulina de pacientes con Artritis Reumatoide. Laboratorios de Inmunología y Biología Molecular, UACB, UAZ.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Microbiota Humana (MH)

La MH se define como el conjunto de microorganismos que residen sobre y dentro del cuerpo humano, incluye bacterias, virus, hongos y arqueas que se ubican en diversas regiones anatómicas (Figura 2.1), mientras que el microbioma humano se refiere a los genomas microbianos interactuando entre sí y con su huésped de maneras complejas que en diversos momentos implican simbiosis, mutualismo, antagonismo o depredación [36]. El sitio mayormente colonizado es el intestino y al conjunto de microorganismos se le denota microbiota intestinal (MI).

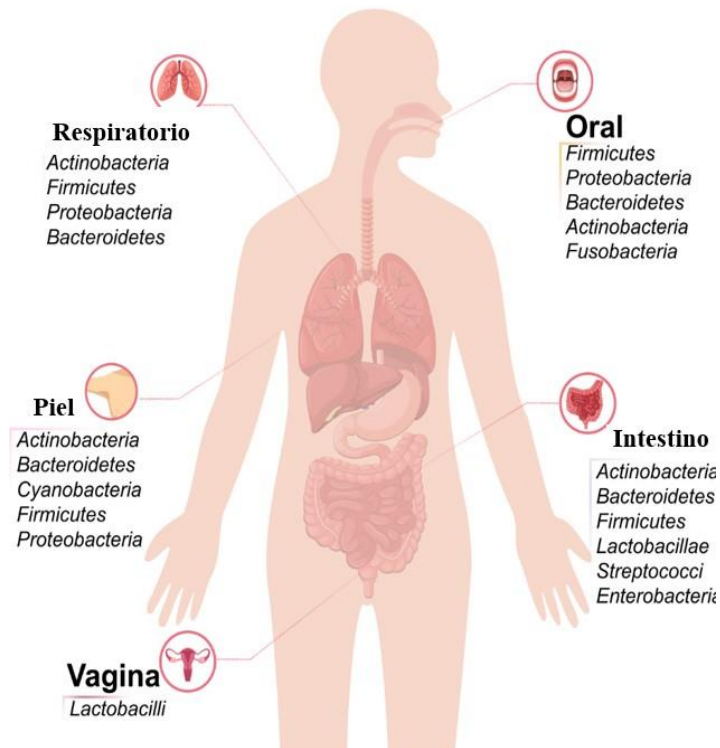


Figura 2.1: Ubicación de la microbiota humana en diversas regiones anatómicas. Adaptada de Sig *Transduct Target Ther*, 2022. Hou et al. [37].

2.2. Microbiota Intestinal (MI)

La MI humana comprende aproximadamente 40 billones de microorganismos y se estiman más de 2000 especies que varían según la anatomía gastrointestinal (GI) en términos de fisiología, pH, tensión de O₂, tasas de flujo (rápido desde la boca hasta el ciego, más lento después), disponibilidad de sustrato y secreciones del huésped [3]. El estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon forman el tracto GI y el entorno se vuelve progresivamente más anaeróbico desde el estómago hasta el colon y cada sección del tracto GI presenta un nicho ecológico único como un sistema abierto en el que los nutrientes entran y los desechos salen de forma intermitente [38-40].

La composición microbiana de los espacios mucosos y epiteliales del tracto GI, es muy diversa, dominada por bacterias, de las cuales el 90% pertenecen a los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Las Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia y Fusobacteria completan el 10% restante junto con el componente fúngico (0.1%) principalmente del filo Ascomycota [8,9,38]. Los Bacteroidetes son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, anaeróbicas y aeróbicas, con forma de bastón; dentro de este filo podemos encontrar al género Prevotella y Bacteroides (sacarolíticas) [41] y al género Porphyromonas; que junto con Prevotella son patógenos de la cavidad bucal [42] y algunos Bacteroides pueden causar infecciones, siendo *B. fragilis* y *B. thetaiotaomicron* las especies mayormente aisladas. La capacidad del filo Bacteroidetes para degradar polisacáridos explica por qué prosperan en el tracto GI [43].

El filo Firmicutes comprende bacterias Gram positivas y está compuesto por más de 200 géneros, entre ellos Lactobacillus, Enterococcus y Staphylococcus, estos se pueden encontrar en el suelo, el agua, la piel y el tracto GI e incluyen bacterias aerobias, anaerobias, formadoras de esporas, saprofitas y patógenas. Los Firmicutes como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pueden producir toxinas proteicas [8,38] y algunos miembros participan en el metabolismo de ácidos biliares que, al parecer, desempeñan un papel fundamental en la inflamación intestinal y el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) [44].

Las Actinobacterias son bacterias Gram positivas que constituyen uno de los filos bacterianos más grandes; producen aproximadamente dos tercios de todos los antibióticos de origen natural de uso clínico, múltiples compuestos anticancerígenos, antihelmínticos y antifúngicos [38]. De hecho, son de los primeros colonizadores de recién nacidos que contribuyen a la maduración del Sistema Inmune (SI) y algunas cepas son consideradas probióticas [45]. Dentro de los comensales GI se encuentra el género *Bifidobacterium*, pero también incluye especies patógenas de *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Propionibacterium* [46].

El filo Proteobacteria se dividen en seis clases: α , β , γ , δ , ϵ y ζ con base en el parentesco molecular determinado por análisis filogenético del gen 16S rRNA [47]. Los géneros notables son *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Desulfovibrio* y *Helicobacter*, aunque también incluye a la familia Enterobacteriaceae. Algunos patógenos entéricos de este filo son *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* y un rasgo común es la tinción Gram negativa, que indica la presencia de lipopolisacárido en la membrana externa [38].

Por otro lado, el filo Verrucomicrobia alberga a *Akkermansia muciniphila* que representa del 1 al 4% de la población bacteriana del colon [48]. Esta bacteria es un miembro importante ya que degrada las mucinas para producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que nutren al huésped y lo incitan a compensar con la producción de más mucinas, manteniendo la dinámica de estas proteínas [49]. Por el contrario, el filo Fusobacteria está formado por bacterias Gram negativas, comúnmente presentes en el tracto GI humano y animal, y los estudios filogenéticos recientes han sugerido agruparlas en un filo distinto [50,51].

El filo Ascomycota es el componente fúngico de la MH que ha sido descuidado debido a su escasa riqueza en comparación con las bacterias, sin embargo, la capacidad de los hongos para modular la respuesta inmune del huésped lo han convertido en un componente de estudio fundamental.

Las levaduras más representativas son los géneros *Cándida* y *Saccharomyces* que contienen el mayor número de especies descritas de interacción con el huésped humano. Por un lado, el género *Cándida* ha sido el más estudiado, sin embargo, el género *Saccharomyces*, ha ganado un papel en las investigaciones sobre la interacción humana en la salud y la enfermedad [9]. Los avances en la investigación del microbioma han mejorado nuestra comprensión de su relación con la fisiología y patología humana, gracias al progreso tecnológico.

2.2.1. Técnicas empleadas para estudiar la MI

Las técnicas de cultivo convencionales subestiman el número real de especies y las limitadas condiciones solo favorecen a especies de crecimiento rápido y no exigentes sobre aquellas presentes en bajas concentraciones, que requieren condiciones de cultivo inusuales y/o requisitos nutricionales complejos [52]. Algunas dependen de otros microorganismos “alimentación cruzada” y algunas solo crecerán en nichos con un rango estrecho de pH y/o potencial redox, lo que puede ser difícil de mantener *in vitro*. Los avances metodológicos en técnicas de cultivo anaeróbico son tediosos, requieren de mucho tiempo y de equipo especializado [53]. Además, algunas bacterias pueden estar vivas, pero no ser cultivables [38] y la imposibilidad de una identificación inequívoca sin métodos moleculares.

El desarrollo de enfoques metagenómicos independientes del cultivo ha permitido el estudio de microbiotas complejas [52]; los métodos de secuenciación de alto rendimiento usan el RNAr 16S amplificado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés) y la secuenciación rápida de todos los fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, Deoxyribonucleic acid por sus siglas en Inglés), permiten la identificación de los microorganismos presentes y sus genes metabólicos.

Además de los avances en las técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS, Next Generation Sequencing por sus siglas en inglés) y especialmente a través de enfoques basados en amplicones dirigidos al DNA ribosomal y a la región espaciadora transcrita interna (ITS, internal transcribed spacer por sus siglas en inglés), que es el principal biomarcador genómico de los hongos [54]. Sin embargo, una serie de desafíos técnicos han obstaculizado la aplicación de la metagenómica al estudio del microbioma, principalmente preparación de muestras, extracción de DNA genómico de hongos y escasez de genomas y proteomas de referencia en bases de datos públicas.

Por lo que el cultivo *in vitro*, pese a los problemas que pueda enfrentar, sigue siendo el método principal para la investigación de comunidades microbianas, necesario para el aislamiento y la caracterización fenotípica, bioquímica e inmunológica [55]. No obstante, los impresionantes avances recientes en las tecnologías GNS, junto con los avances y las innovaciones en metagenómica, metabolómica, multiómica, bioinformática y herramientas de inteligencia artificial, han brindado perspectivas para caracterizar mejor las poblaciones microbianas y sus funciones [38].

2.2.2. Funciones de la MI y factores que influyen en su composición

La MI brinda beneficios esenciales para la salud humana, como la prevención de la colonización por patógenos, la desintoxicación de ácidos biliares, el metabolismo de carbohidratos no digeribles y la generación de metabolitos. Así pues, se estima que la microbiota podría proporcionar el 86% de vitamina B6, 37% de vitamina B9, 31% de vitamina B12 y 27% de vitamina B3 de la cantidad diaria recomendada [56-60]. No obstante, existen factores que influyen en su composición siendo el nacimiento quien marca el inicio de la colonización microbiana, sin embargo, su desarrollo se ve afectado por múltiples factores como la administración de antibióticos en el embarazo o la dieta materna [4,61,62].

Recientemente, se ha revelado un nuevo modo de transmisión horizontal del microbioma de madre a hijo y se estima que solo el 9% de la MI corresponde a antecedentes genéticos [63,64]. Otros factores como el modo de nacimiento, la lactancia o alimentación con fórmula y la introducción de antibióticos o alimentos sólidos también han sido asociados [65-69]. El microbioma de un bebé en sus primeros tres años de vida se distingue del microbioma de un adulto y un factor importante en la adultez es la dieta, mientras que otros factores como el estrés, condiciones ambientales, ingesta de medicamentos, estilo de vida, trastornos y procedimientos médicos pueden modificar su composición [70-73].

De manera análoga, se ha descrito que un componente de inmunidad adaptativa ya está presente en el feto humano y cuando se introducen alimentos sólidos, se produce un cambio en la composición de su comunidad bacteriana intestinal, aumenta la diversidad metabólica y evoluciona hacia una microbiota más parecida a la adulta. A este período se le llama “ventana de oportunidad” debido a que las señales externas tienen un profundo impacto en la salud de por vida, en la evolución de la microbiota y en el Sistema inmune (SI), de tal modo que los múltiples cambios que sufre la microbiota durante las primeras etapas de vida, conducen a un establecimiento posnatal temporal del SI intestinal (Figura 2.2).

Un hallazgo importante ha sido la revelación de sus interacciones donde los microorganismos transforman y metabolizan sustancias derivadas de la dieta y del huésped para generar un conjunto diverso de metabolitos con importantes resultados locales y sistémicos, construyendo una red de vías de señalización inmunológica [4,36].

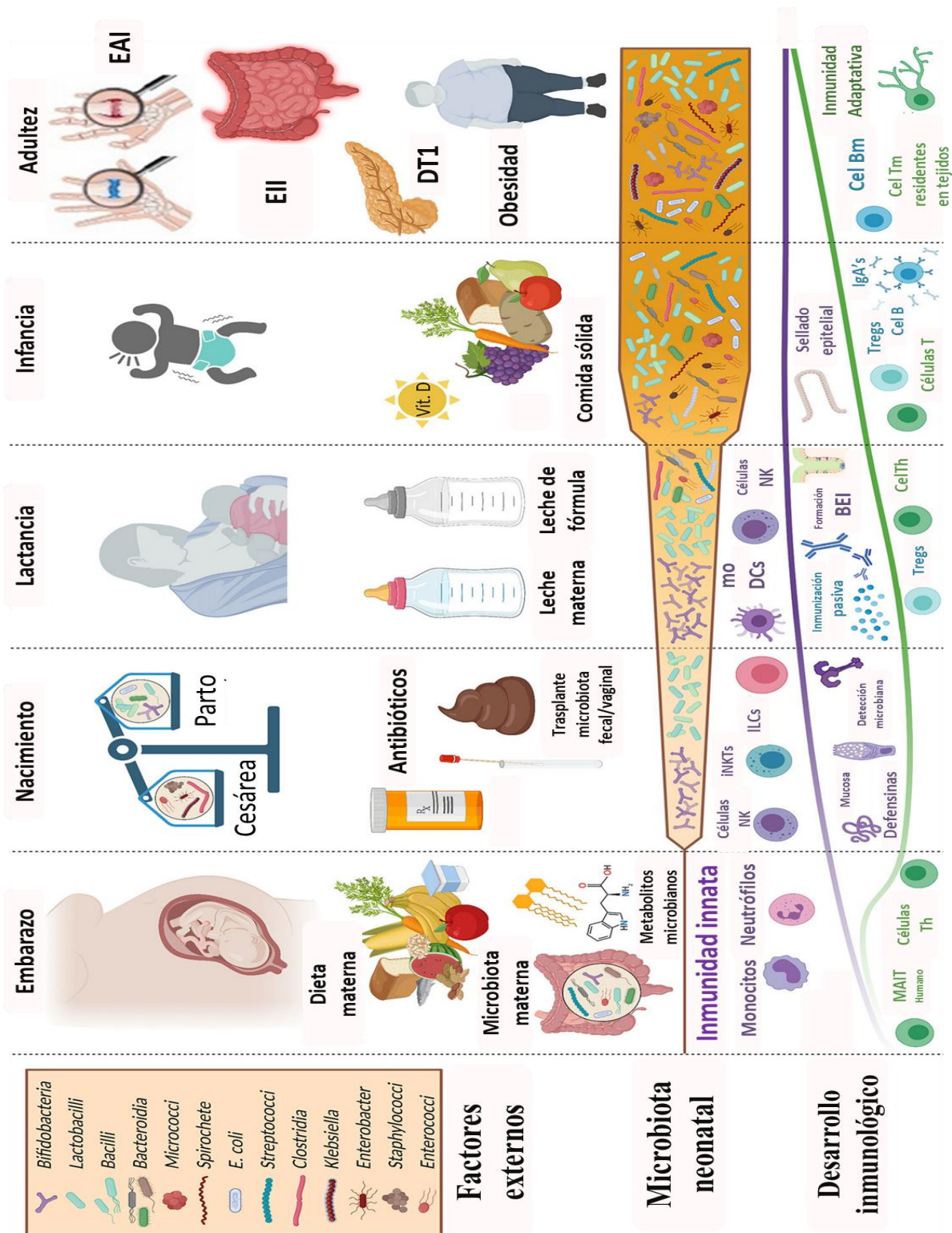


Figura 2.2: Factores ambientales que determinan el desarrollo de la MI y el SI. Adaptada de *Front. Immunol*, 2021. Kalbermatter et al. [4].

2.3. Sistema Inmunitario (SI)

El SI está constituido por células y moléculas responsables de la inmunidad, la cual se define como protección frente a la enfermedad, y su función fisiológica es la defensa contra microbios infecciosos, sustancias extrañas no infecciosas y productos de células dañadas o malignas, que de forma conjunta y coordinada a la introducción de estas sustancias, el SI presenta respuestas mediadas por reacciones tempranas de la inmunidad innata y tardías de la inmunidad adaptativa, independientemente de la consecuencia fisiológica o patológica [74]. Al conjunto de células y moléculas inmunitarias que realizan funciones especializadas en un sitio anatómico particular se le conoce como SI regional que abarca el SI cutáneo (piel) y el SI de mucosas [4].

2.3.1. Sistema Inmune de Mucosas (SIM)

El SIM es un grupo especializado de células inmunitarias innatas y adaptativas que cumplen funciones de barrera muy importantes, principalmente con los epitelios que protegen al huésped de infecciones y agresiones ambientales en las superficies de las membranas mucosas. Estas superficies son inmunológicamente únicas, ya que actúan como interfaz principal entre el huésped y el entorno físico y desempeñan funciones protectoras y reguladoras en las barreras mucosas broncopulmonar, genitourinaria y digestiva (Figura 2. 3) [75].

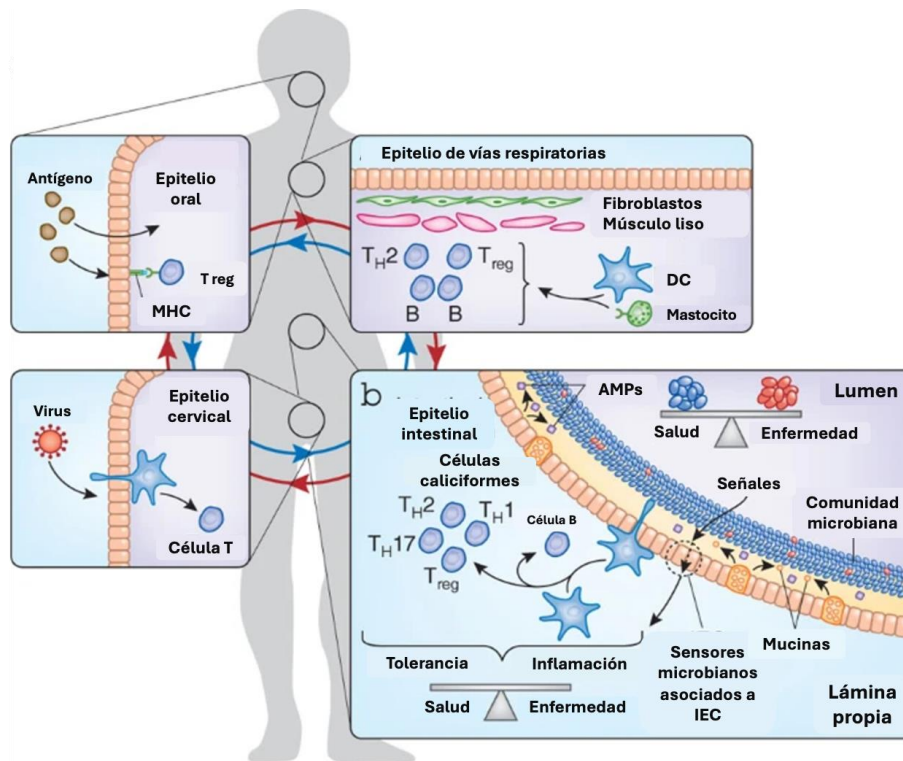


Figura 2.3: Sistema inmune de mucosas. Adaptada de *Nature immunology*, 2010. Gill et al. [58].

2.3.1.1 Sistema inmune digestivo

El SI digestivo comprende la capa mucosa, células inmunes hematopoyéticas, estructuras linfoides organizadas, la lámina propia (LP) y el epitelio [76]. Dado que el intestino soporta una gran carga antigénica, requiere de una respuesta rápida e inespecífica, para mantener la homeostasis y proteger al organismo de la entrada de patógenos, esta es la inmunidad innata.

2.3.1.1.1 Inmunidad innata en el tracto gastrointestinal

Está mediada por el recubrimiento epitelial mucoso, que impide la invasión microbiana gracias a uniones intercelulares herméticas, la secreción de moco y la producción de moléculas antimicrobianas como las defensinas.

Las células inmunitarias innatas efectoras de la LP son los macrófagos, las células dendríticas (CD), las células linfoides innatas (CLI) y los mastocitos. También, una comunidad de linfocitos intraepiteliales (LIE) T como los $\gamma\delta$ ($LT\gamma\delta$), defienden contra los microbios en la BEI. La capa mucosa es la primera línea de defensa, compuesta por glicoproteínas mucosas (MUC) y mucinas O- glicosiladas que se unen a las células epiteliales intestinales (CEI) y cubren la superficie apical; el moco cumple funciones importantes: 1. Protege contra la invasión de patógenos, 2. Construye una barrera física entre los microbios y el tejido del huésped, 3. Protege contra la auto digestión del tejido intestinal y 4. Modula la expansión de diferentes cepas bacterianas y la composición de toda la comunidad.

Las mucinas también sirven como fuente de nutrientes para algunas bacterias, que las escinden para utilizarlas como fuente de energía que, a su vez, liberan AGCC beneficiosos para el huésped [4,77]. El moco contiene péptidos antimicrobianos (PAM) como las defensinas, procedentes de células de Paneth, e inmunoglobulina secretora tipo A (IgAs) derivadas de células plasmáticas (CP) LP. Así pues, las células innatas de la mucosa detectan la presencia de microbios a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), tanto en el contexto de una infección como en condiciones homeostáticas.

Algunas moléculas microbianas se unen a estos receptores como el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular externa de las bacterias Gram negativas que posteriormente activan mecanismos inmunes innatos. Esta activación puede desencadenar un estado proinflamatorio para la eliminación de patógenos o inducir tolerancia a los comensales al aumentar la producción de mucinas y PAM y a su vez, promover el recambio de CEI y mediar en la supervivencia de las células madre. Cabe resaltar que la composición y función de las células inmunitarias puede cambiar durante el envejecimiento [4,78,79].

2.3.1.1.2. Inmunidad adaptativa en el tracto GI

El SI adaptativo comprende cúmulos subepiteliales de tejido linfóide [74]. Estos compartimentos se pueden clasificar en sitios inductivos y sitios efectoros.

Los *inductivos* corresponden a los Nódulos Linfáticos Mesentéricos (NLM) que drenan el intestino, y al tejido linfoide asociado al intestino (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue por sus siglas en inglés) que constituyen las Placas de Peyer (PP) del íleon (intestino delgado), el apéndice vermiforme y los Folículos Linfoides Aislados (FLA) que se distribuyen a lo largo del intestino delgado y grueso. Otros tipos de GALT multifoliculares son los tejidos linfoides rectales [80-83] y aunque la existencia de GALT se conoce desde hace siglos, su potencial para regular las respuestas inmunes, no están completamente claras [76].

Las PP son sitios de cebado inmunológico adaptativo que contienen varios nichos micro anatómicos especializados para el inicio y propagación eficiente de respuestas inmunes, sus folículos están asociados con la luz intestinal y poseen un Epitelio especializado Asociado al Folículo (EAF) que está escasamente cubierto por moco, pero rico en CEI especializadas llamadas células M que transportan antígeno libre y unido a IgA hacia las PP. De hecho, el EAF contiene LIE, pero su función aún no está clara [84-87]. Por su parte, las células M forman bolsas que permiten la interacción con células inmunes que se encuentran en la Cúpula Subepitelial (CSE) dominada por CD Presentadoras de Antígenos (CPA) profesionales que extienden sus dendritas a través de poros transcelulares para tomar muestras del antígeno luminal.

Asociado con la CSE está el folículo de células B que contiene Centros Germinales (CG) activos y alrededor, hay una zona de células B vírgenes rodeadas por una Zona Marginal (ZM) más grande que contiene células B de memoria, predominantemente de los isotipos IgA e Inmunoglobulina tipo M (IgM) y células B que generan respuestas innatas a antígenos T independientes [88-93]. Consecuentemente, la activación y respuesta de células B en el intestino dan forma a la MI a través de la secreción de IgA. De este modo, cuando las células B vírgenes alcanzan el estado maduro, pueden activarse y diferenciarse hacia Células Plasmáticas (CP) quienes pueden encontrar antígenos en áreas extra foliculares dentro de la LP; este proceso induce su transformación en CP secretora de IgM.

Alternativamente, las células B pueden ingresar a las áreas foliculares ubicadas en las PP donde interactúan estrechamente con células CD4+ previamente activadas [94]. Junto a estos folículos, las PP contienen zonas de células T perifoliculares que sirven como reservorios para células T vírgenes y de memoria enriquecidas con células T de memoria central (Tmc) CD4+, células T reguladoras (Treg) FOXP3+ y células T foliculares auxiliares (Tfh) (Figura 2.4).

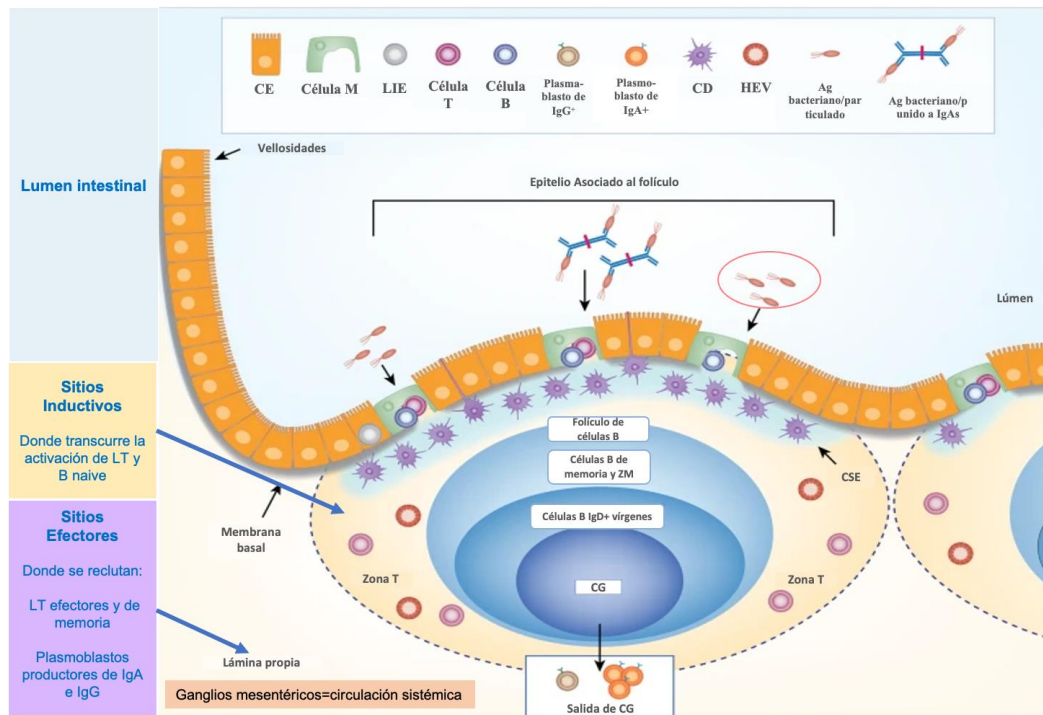


Figura 2.4: Composición celular de un folículo de PP humanas. Adaptada de *Mucosal Immunology*, 2021. Morbe et al. [76].

También se ha considerado que las PP humanas son sitios clave para la inducción de respuestas de anticuerpos (Abs, Antibodies por sus siglas en inglés) intestinales, que contribuyen a la maduración de CEI y pueden desempeñar un papel en la eliminación de clonas de células B autorreactivas [95-98]. Por último, los *sitios efectores* corresponden al epitelio y a la LP en donde se encuentran las células inmunes innatas y adaptativas preparadas para promover la inmunidad protectora frente a la MI y la integridad de la BEI [76].

2.4. Barrera Epitelial Intestinal (BEI) y uniones celulares

La BEI es la última barrera defensiva formada de una sola célula de espesor que absorbe nutrientes y bloquea la entrada de moléculas inmunogénicas como patógenos, endotoxinas y proteínas dietéticas no digeribles, evita que lleguen a la LP subyacente para que no se infiltren en el cuerpo, por lo que cuidar su integridad es importante para mantener la salud. Esta barrera, incluye CEI y un sistema de uniones celulares complejas compuestas por uniones estrechas (TJ, tight junctions por sus siglas en inglés), uniones Adherentes (AJ, Adherent junctions por sus siglas en inglés) y desmosomas [99,100].

2.4.1 Uniones Estrechas (TJ)

Las TJ forman una red ramificada continua y estrecha entre las membranas de las células vecinas, lo que lleva al sellado completo del espacio intercelular apical y están compuestas por más de cuarenta proteínas, entre ellas, una estructura transmembrana compuesta por Claudinas, Ocludinas y Moléculas de Adhesión de Unión (JAM, Junction Adhesion Molecules por sus siglas en inglés) que regulan y determinan la permeabilidad, permitiendo el ingreso selectivo de moléculas y evitando la migración de proteínas y lípidos desde el lado apical al basolateral. [101-104].

A saber, existen dos tipos de Claudinas, las selladoras y las formadoras de poros, cada una tiene diferente especificidad por cationes o aniones y selectividad por tamaño iónico, estas regulan el flujo de iones y la pérdida de electrolitos [104]. Por su parte, las ocludinas son fosforiladas y están relacionadas con la regulación de la difusión intermembrana y paracelular de moléculas pequeñas. Finalmente, las proteínas JAM caracterizadas por su similitud con inmunoglobulinas (Igs), contienen un dominio PDZ (Acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas, PSD95, DigA y ZO-1) citoplásmico involucrado en la adhesión célula-célula y también se han implicado en la proliferación y migración celular. [105-108].

La estructura transmembrana se une al citoesqueleto a través de una placa citoplasmática de proteínas de andamiaje como Zonula Occludens (ZO 1-3) quienes contienen tres dominios PDZ y un dominio GUK (homólogo de guanilato quinasa) que se unen al extremo C de las claudinas y ocludinas respectivamente. Adicionalmente, se unen Cingulinas y proteínas involucradas en la transducción de señales [109-112]. Las regiones C-terminales de ZOs interactúan con microfilamentos de actina y miosina a quienes se les atribuye un papel importante en la regulación de la apertura y sellado del complejo. De esta manera, la miosina participa en la regulación del ensamblaje, mientras que la actina se une a las proteínas de andamiaje citoplasmático (Figura 2.5) [113-117].

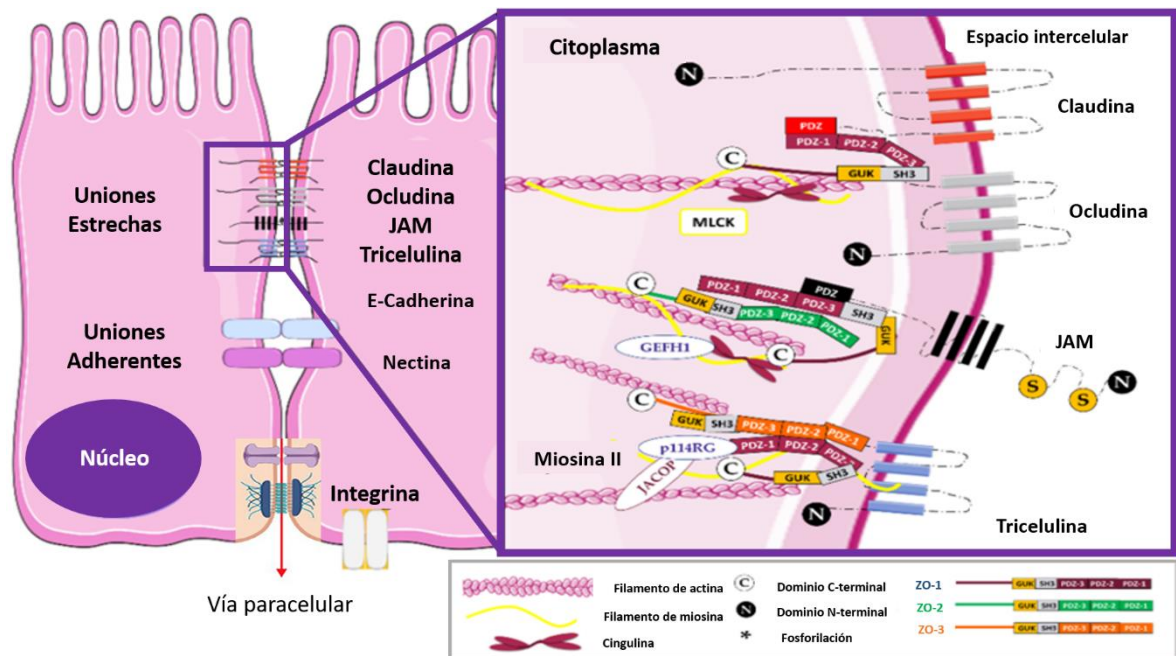


Figura 2.5: TJ en células epiteliales intestinales. Adaptada de *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Paradis et al. [118].

Al mismo tiempo, las TJ actúan como sitios para la integración y transmisión de señales necesarias para la regulación de su ensamblaje y la polarización celular. También participan en la modulación de la expresión génica necesaria para la diferenciación celular, proliferación, y en respuesta al estrés. Además, para su maduración y mantenimiento, son esenciales las AJ que son estructuras subcelulares construidas a partir de receptores de cadherina clásicos que median las interacciones físicas entre células. Su principal proteína implicada en el ensamblaje es la E-cadherina, cuyo dominio intracelular está asociado con p120, β -catenina y α -catenina, formando un complejo que se une a los filamentos de actina [119,120].

Además, al regular la organización del citoesqueleto de actina subyacente, se establece un centro para la señalización celular y la regulación de la transcripción génica. Finalmente, los desmosomas proporcionan resistencia mecánica al contacto intercelular célula-célula en el epitelio y su composición incluye dos subtipos de cadherinas transmembrana, a saber, las desmogleínas y desmocollinas. Estas proteínas, a través de la unión con placofilina y desmoplaquina, pueden unirse a filamentos intermedios proporcionando estabilidad al estrés mecánico debido al movimiento peristáltico del intestino. En suma, el complejo TJ es el principal regulador de la permeabilidad paracelular y el único modulador fisiológico de este complejo, es la Zonulina [121-124].

2.3.1.1 Zonulina

La Zonulina es una proteína humana análoga de la toxina Zot de *Vibrio cholerae*, que regula el complejo TJ y permite la permeabilidad paracelular. Se ha señalado que grandes cantidades de Zonulina pueden liberarse de biopsias intestinales, siendo el receptor de quimiocina CXCL3 tipo 3 (CXCR3) el principal responsable de su liberación en el intestino [125-127].

Además, la Zonulina contiene un motivo similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor por sus siglas en inglés) y al péptido activador del receptor activado por proteínasa 2 (PAR2, Proteinase Activated Receptor 2 por sus siglas en inglés) y se sabe que la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor por sus siglas en inglés) es inducida por PAR2 a través de la vía Ras-MAP-cinasa (Mitogen-Activated Protein kinases por sus siglas en inglés) que tiene un impacto importante en los procesos epiteliales [128-131].

Pues bien, la activación de PAR2 induce el recambio de fosfatidil inositol (PPI, Phosphatidyl Inositol por sus siglas en inglés) y la estimulación de la fosfolipasa C, lo que conduce a la activación de Diacilglicerol (DAG) y la liberación de calcio (Ca^{2+}) intracelular a través del incremento de inositol trifosfato (IP-3) que a su vez, induce la activación de PKC (Protein Kinase C por sus siglas en inglés) [132-134] y causa despolimerización y reducción de la densidad periférica de las fibras de actina, lo que lleva a un reordenamiento citoesquelético y fosforilación de ZO-1, provocando su dislocación de la membrana celular [135] que finalmente, conduce a un desmontaje transitorio del complejo TJ y por consiguiente, al aumento de la permeabilidad paracelular (Figura 2.6) [136].

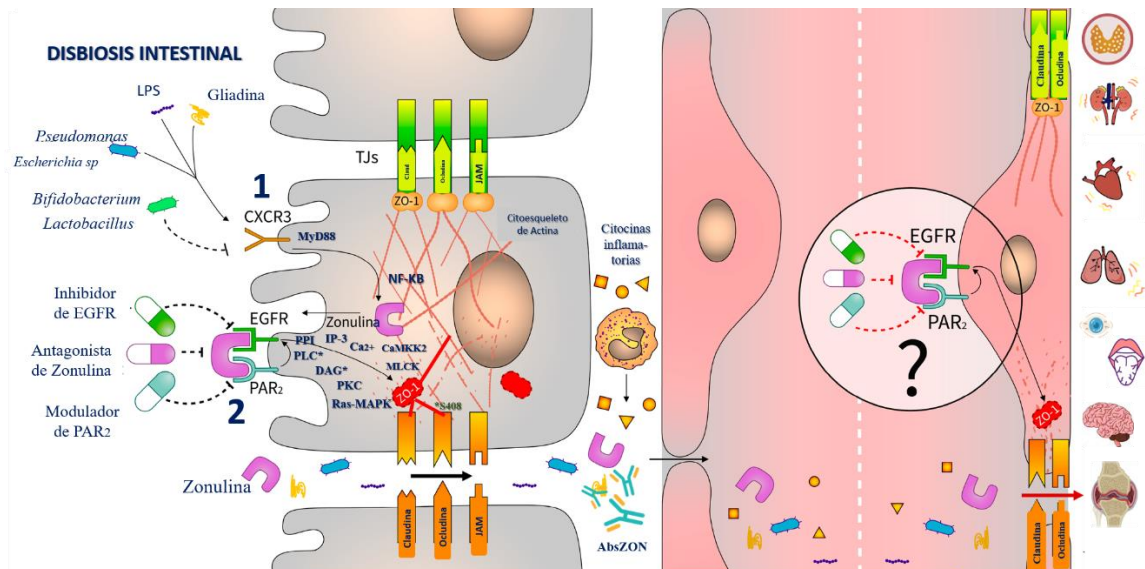


Figura 2.6: Modulación del complejo TJ por Zonulina. Adaptada de *Int. J. Mol. Sci.*, 2023. Veres-Székely et al. [129].

Se ha descrito que los agentes luminales microbianos pueden activar la liberación de Zonulina dependiente de CXCR3 [137] conduciendo a la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88, Myeloid Differentiation por sus siglas en inglés) y un estudio en ratones describe que el daño por LPS es un mecanismo dependiente de CXCR3 relacionado con la vía de señalización del Factor Nuclear Kappa B (NF-kB, Nuclear Factor KB por sus siglas en inglés) [138]. Pues bien, el efecto de la vía de la Zonulina en la regulación de la PI ha sido respaldado por estudios clínicos de fase 2 que demuestran el efecto beneficioso del antagonista de la Zonulina acetato de larazotida (AT-1001) [139].

No obstante, los mecanismos involucrados en la dinámica del complejo TJ no están del todo dilucidados y se limita la comprensión de su papel en la prevención de la invasión de microbios residentes del intestino. Sin embargo, se ha propuesto que la Disbiosis Intestinal (DI) puede alterar estos mecanismos de regulación.

2.5. Disbiosis Intestinal (DI)

La DI es un término general que refiere el desequilibrio de la MI relacionado con resultados desfavorables, así pues, es causada por una inestabilidad en su composición funcional y actividades metabólicas [140-143]. Numerosas variables, incluidas infecciones, nutrición, ejercicio, hábitos de sueño, exposición a antibióticos y una serie de comorbilidades, podrían contribuir a la inestabilidad de la MI [105,106]. En consecuencia, puede ocasionar alteraciones en la integridad de la BEI provocando un aumento en la permeabilidad intestinal (PI) y, por consiguiente, desregulación de las rutas de señalización que causan no solo trastornos GI sino también de otros órganos y sistemas distales (Figura 2.7) [140-144].

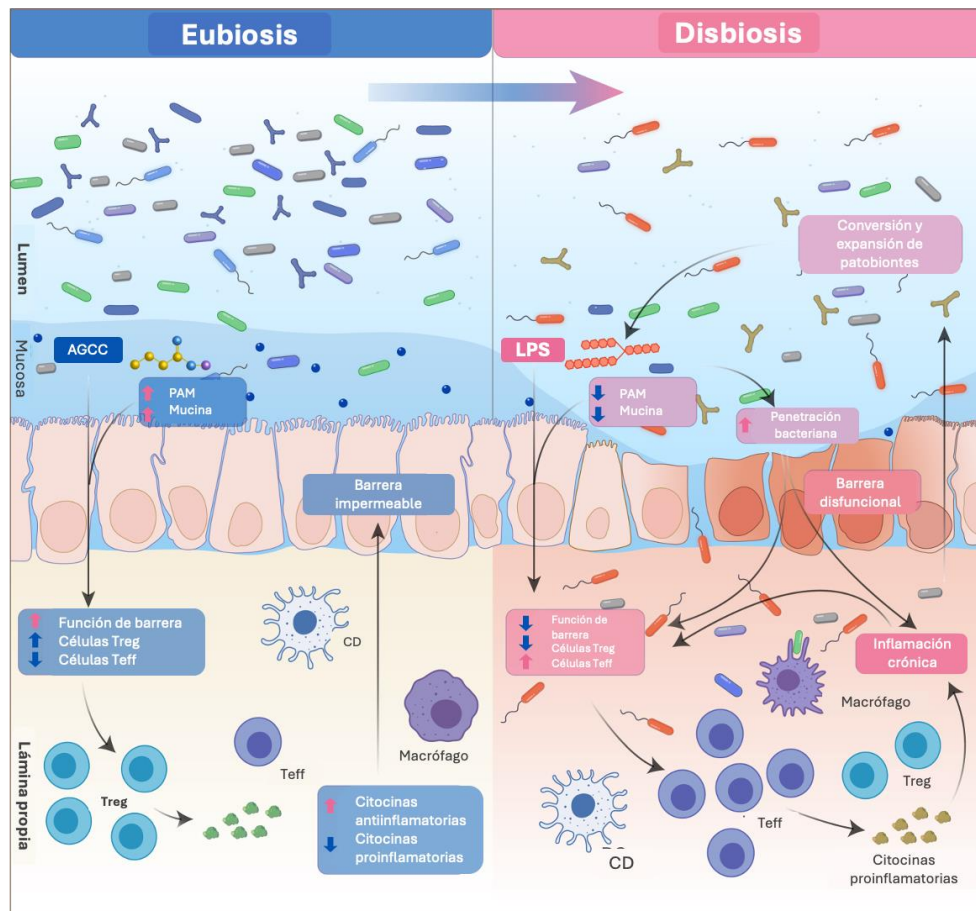


Figura 2.7: Disbiosis y aumento en la PI. Adaptada de *Sig Transduct Target Therapy*, 2022. Hou et al. [37].

2.6. Permeabilidad Intestinal (PI)

Sólo una fina capa de epitelio especializado separa nuestros órganos internos de billones de microbios intestinales [145] que, por un lado, debe evitar que nos invadan [146-148] y, aun así, permitir el paso de moléculas beneficiosas para el huésped, esto suele ocurrir por vía paracelular o transcelular a través de enterocitos. Además, una tercera vía, sin restricciones, se activa en sitios de daño erosivo y ulcerativo donde la pérdida de integridad celular permite el aumento de PI y en consecuencia, el paso de iones, metabolitos e incluso bacterias completas [149,150].

Por si fuera poco, mientras algunas bacterias beneficiosas ejercen efectos protectores de barrera [151], otras aprovechan los mecanismos reguladores de las TJ para la invasión [148,152], por ende, las proteínas de integridad de barrera pueden ser objetivos directos de los microbios, a saber, recientemente se han descrito las capacidades de los patógenos para atacar a las TJ con el objetivo de promover la invasión de la mucosa intestinal y la diseminación al huésped [118]. Sumado a esto, otros factores entre los que destacan los fármacos, contribuyen a su ruptura [148,150,153-155].

2.6.1. Mecanismos de ataque al complejo TJ por bacterias

En estado estacionario, el SIM permite que algunos comensales y patógenos accedan más allá de la capa epitelial sin causar daño [146,147], como mecanismos de inducción de IgA en un contexto no inflamatorio y tolerancia de células T. En vista de ello, algunos comensales dentro de los tejidos linfoides promueven la tolerancia al inducir interleucina (IL)-10 e IL-22 por las CD y CLI3, respectivamente, que inhiben respuestas de células T auxiliares 17 (Th17, T helper por sus siglas en inglés) y facilitan la colonización microbiana, por el contrario, en presencia de defectos inmunes estos comensales podrían diseminarse [156,157].

Por esta razón, algunos patógenos han desarrollado estrategias para explotar las células de muestreo y facilitar su invasión, incluidos los pili que median la adhesión y los sistemas de secreción tipo III y IV que inyectan proteínas efectoras en las células huésped [146-148]. Aunado a esto, algunos patógenos han logrado el paso paracelular [158,159] y bajo este contexto, los comensales también podrían acceder a través de esta vía [152], además se han revelado las principales proteínas del complejo TJ como blanco de patógenos en el proceso de infección (Tabla 2.1) [118].

Finalmente, más allá de la absorción fisiológica microbiana por células huésped, y según el contexto o el tipo de bacteria, la translocación de microbios puede ocurrir como resultado de DI, aumento de PI y alteraciones en el SIM [78,160,161].

Tabla 2.1. Principales proteínas del complejo TJ, blancos de patógenos.

Patógenos	Proteínas		
	Ocludina	Claudinas	ZO 1-3
1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	Disociación +/- degradación del complejo TJ		
2. <i>Campylobacter jejuni</i>	Modificación de la distribución celular		
	Disociación +/- degradación del complejo TJ		
3. <i>Clostridium difficile</i>	Modificación de la distribución celular		Modificación de distribución celular
	Disociación +/- degradación de C-TJ		Disociación +/- degradación C-TJ c
4. <i>Clostridium perfringens</i>	Modificación de la distribución celular		
5. <i>Escherichia coli</i> ECEA, ECEH, ECEP, ECET, K12.	ECEA/ECEH: Modificación de la distribución celular		
	ECEP/ECET: Modificación de la distribución celular + Disociación +/- degradación del complejo TJ		
	ECEP/K12: Modificación de la expresión génica + Variación en la cantidad de proteína		
6. <i>Helicobacter pylori</i>	Disociación +/- degradación del complejo TJ		
7. <i>Listeria monocytogenes</i>	Modificación de la distribución celular		
8. <i>Salmonella typhimurium</i>	Variación en la cantidad de proteína + Modificación de la distribución celular		
9. <i>Staphylococcus aureus</i>	Variación en la cantidad de proteína		Variación en la cantidad de proteína
10. <i>Shigella flexneri</i>	Variación en la cantidad de proteína + Modificación de la distribución celular		
11. <i>Vibrio cholerae</i>	Variación en la cantidad de proteína+ Modificación de la distribución celular		Variación en cantidad de proteína+ Modificación de distribución celular
12. <i>Yersinia enterocolitica</i>	Variación en la cantidad de proteína	Variación en cantidad proteína + Modificación y distribución celular	Variación en la cantidad de proteína
13. <i>Candida albicans</i>	Variación en la cantidad de proteína		

ECEA = *E. coli* enteroagregativa, ECEH = *E. coli* enterohemorrágica, ECEP = *E. coli* enteropatógena, ECET = *E. coli* enterotoxigenica.

2.7. Translocación Microbiana (TM)

La capacidad de los microbios para translocarse depende de factores de virulencia, de su capacidad para competir dentro del nicho GI, de su abundancia y proximidad a la BEI y de evadir las defensas inmunes. Otro factor que contribuye con lo anterior, es la evasión de la barrera vascular intestinal (BVI) y la barrera linfática intestinal (BLI). Así pues, las bacterias que atraviesan el sistema capilar invaden la circulación enterohepática y viajan al hígado a través de la vena porta [148,152,162-166]. Además, la propagación de fragmentos microbianos, toxinas y factores inflamatorios derivados del intestino, incluida la Zonulina, llegan a órganos distantes [129].

Se ha documentado la translocación de *Enterococcus* y *Lactobacillus* en huéspedes propensos a la autoinmunidad, dichos géneros parecen ser predominantes en condiciones patológicas [167,168], asimismo, patógenos como *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) translocan a los NLM en ratones gnotobióticos (libres de gérmenes) humanizados que juntos promueven respuestas Th17 [152,169]. En definitiva, la MI que ingresa al organismo, que logra atravesar las barreras naturales y alterar el SIM, ahora se considera un factor importante en el inicio o exacerbación de EAI [37,38].

2.8. Influencia del microbioma en autoinmunidad

La causa de las EAI se debe a una falla en la tolerancia inmunológica que desencadena una respuesta inmune a las propias moléculas [170]. Varios estudios han revelado que la MI puede ser el origen en la ruptura de la tolerancia, o contribuir al desarrollo de estos trastornos [16]. El SI y la microbiota colaboran para integrar los brazos innato y adaptativo de la inmunidad para que las respuestas inmunológicas y tolerogénicas se determinen y finalicen de la mejor manera [171]. Así pues, no es sorprendente que el intestino contenga la mayor cantidad y diversidad de compartimentos y células inmunes del cuerpo [74,76]. De este modo, se ha propuesto que cuando esta relación mutualista se ve afectada por eventos disbióticos, se producen respuestas inmunes locales y sistémicas desreguladas [12,13].

A continuación, se presentan los mecanismos que conectan la DI con las vías autoinmunes implicadas en el desarrollo de enfermedades.

2.8.1. Mecanismos de la inmunidad innata

Los mecanismos innatos involucran disfunción de CD intestinales relacionadas con la inmunidad y la tolerancia debido a cambios en poblaciones bacterianas [14]. Por otro lado, la ausencia de MI en ratones impacta en la formación, flexibilidad y actividad de CLI [172], se deteriora la formación de neutrófilos, y la función fagocítica.

Por su parte, la MI que se dirige al nicho que promueve la hematopoyesis en la médula ósea, controla la generación de neutrófilos [173] y el dominio 1 de oligomerización de nucleótidos del receptor citosólico (NOD1, nucleotide oligomerization domain 1 por sus siglas en inglés) reconoce el peptidoglicano de la MI y mejora la capacidad de destrucción de los neutrófilos [174]. También se ha descrito que los ratones libres de gérmenes tienen densidades de mastocitos intestinales más bajas, pero porcentajes sistémicos más altos.

Así mismo, el peptidoglicano y el LPS activan el macrófago C a través de los receptores tipo toll (TLR, Toll-like receptor por sus siglas en inglés) TLR2 y TLR4 respectivamente [175] y ETEC induce daño en la BEI, que podría ser evitado mediante la transferencia de células asesinas naturales (NK, natural killer por sus siglas en inglés) de la LP, además de aumentar la expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (p-STAT3, signal transducer and activator transcription 3), tirosina cinasa 2 (p-TYK2, Tyrosine kinase 2, por sus siglas en inglés) e IL22R1, que son factores importantes en la función de la BEI junto con ZO-1, Claudina y Ocludina [176].

Sumado a esto, los *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) tienen la capacidad de aumentar la expresión de IL-22 y de miembros de la familia del receptor de citotoxicidad natural (NCR, natural cytotoxicity receptor por sus siglas en inglés) en células NK; una característica que las hace especiales es su capacidad para discriminar entre lo “propio” y lo “no propio” a través del sistema de vías de señalización formado por receptores activadores e inhibidores [177,178].

2.8.2. Mecanismos de la inmunidad adaptativa

Un mecanismo propuesto es el desequilibrio de células TCD4+ (Th1 disminuida en ausencia de *Bacteroides fragilis*, Th2, Th17 y Tfh aumentadas por el incremento de bacterias filamentosas segmentadas (BFS) y reducción de Treg por la disminución de *Clostridium cluster*. Otro es el agotamiento de células CD8+ y su citotoxicidad en ratones libres de gérmenes. Finalmente, se observa la disminución de otras células inmunes periféricas como las células B de la ZM, disfunción de CD plasmocitoides y NK invariables (NKi) [179].

También la disminución de butirato derivado de la MI reduce el metabolismo celular, afecta la memoria de células CD8+ activadas y perjudica las respuestas de recuperación óptimas después del reencuentro con el antígeno, ya que se sabe que los metabolitos microbianos guían el recableado metabólico para permitir su transición como células de memoria [15]. Por su parte, las células B pueden funcionar como CPA y generar una cantidad significativa de citocinas, además de producir Abs. En suma, las células B reguladora (B reg) que producen IL-10, tienen la capacidad de reducir la inflamación autoinmune [180].

Otros mecanismos que vinculan al microbioma con la autoinmunidad son la PI, la TM y el mimetismo molecular que provoca una activación cruzada de células inmunomoduladoras a autoantígenos. Sin embargo, la genética del huésped es crucial para la detección de antígenos relacionados con el antígeno leucocitario humano (HLA, human leukocyte antigen por sus siglas en inglés); todas ellas, son pistas esenciales para desencadenar respuestas autoinmunes [12,19]. No obstante, en ocasiones el tejido diana puede estar alejado del intestino, como es el caso de la AR.

2.9. Artritis Reumatoide (AR)

La AR es una enfermedad heterogénea, no transmisible clasificada en la categoría de enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo; se define como EAI sistémica con actividad inflamatoria y conjuntamente se describe como poliartritis simétrica con un curso crónico gradual y persistente que afecta principalmente a las articulaciones de las manos y los pies [181] en las que se desarrollan distintos procesos que deterioran el cartílago y el hueso, conduciendo a incapacidad.

La prevalencia global se estima en el 1% de la población general siendo más frecuente en mujeres mayores de 40 años en una proporción 3:1 y puede presentarse en distintos grupos etarios. Así pues, esta enfermedad es tratable desde el momento del diagnóstico, pero se sabe que comienza a desarrollarse tiempo antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas [182].

2.9.1. Manifestaciones clínicas de la AR

Las principales manifestaciones son la rigidez matutina, hinchazón de las articulaciones que afecta a más de tres, con sensibilidad en las metacarpofalángicas y metatarsfalángicas. La afectación de la articulación axial y de la columna cervical es menos común. Las articulaciones temporomandibulares y cricoaritenoideas también pueden verse afectadas. La presentación clínica y el curso de la enfermedad varían entre los pacientes, y algunos tienen poliartritis de inicio muy agudo [181,183]. La inflamación y el dolor se inicia en membrana sinovial y posteriormente en cartílago, ligamentos, cápsula y hueso.

Otros órganos pueden ser afectados como el pulmón, riñón, piel, ojos y corazón, e incluso sistemas como el neurológico y hematopoyético. También se hace presente la fatiga, malestar general, depresión, fiebre y pérdida de apetito, sin embargo, muchos de estos síntomas pueden exacerbarse como consecuencia de algún factor desencadenante [184].

2.9.2. Etiología y Fisiopatología de la AR

Múltiples factores, como los genéticos, tabaquismo, autofagia, y microorganismos infecciosos se han asociado con AR y es necesario recalcar su papel en la generación de antígenos citrulinados [185]. En primer lugar, la participación de los alelos HLA clase II que codifican las cadenas de proteínas alfa y beta expresadas en la superficie celular de CPA es crucial para la patogénesis. Por ende, el alelo DRB1*0401, que codifica una secuencia particular ubicada entre los residuos 60 a 74 de la región hipervariable 3 de la cadena beta, se conoce como "epítipo compartido", que es fundamental para la unión de autoantígenos.

Por lo tanto, el "epítipo compartido" parece aumentar la susceptibilidad de los individuos a desarrollar AR, ya que el 50% de los pacientes que albergan este alelo son positivos para el FR y el 90% desarrolla complicaciones graves o manifestaciones extraarticulares. A su vez, el epítipo compartido permite la translocación de calreticulina, que aumenta la señalización dependiente de Ca^{2+} lo que permite que se activen las enzimas PADs [186,187].

2.9.2.1. Enzimas PADs y el proceso de citrulinación

Las PADs de mamíferos pertenecen a una familia de enzimas hidrolasas que convierten la peptidilarginina en residuos de peptidilcitrulina en el proceso de citrulinación de proteínas. Este proceso también es conocido como deiminación en donde las enzimas PADs modifican el grupo guanidino. En esta reacción, la hidrólisis de los átomos de nitrógeno de la cadena lateral de la arginina da como resultado la formación de citrulina y amoníaco como producto secundario (Figura 2.8). Las PADs interactúan con sitios de unión específicos en proteínas y debido al grupo guanidino, la arginina tiene una carga positiva a pH fisiológico mientras que la citrulina no tiene carga (neutra), por lo que la carga general de la proteína disminuye por la citrulinación [188].

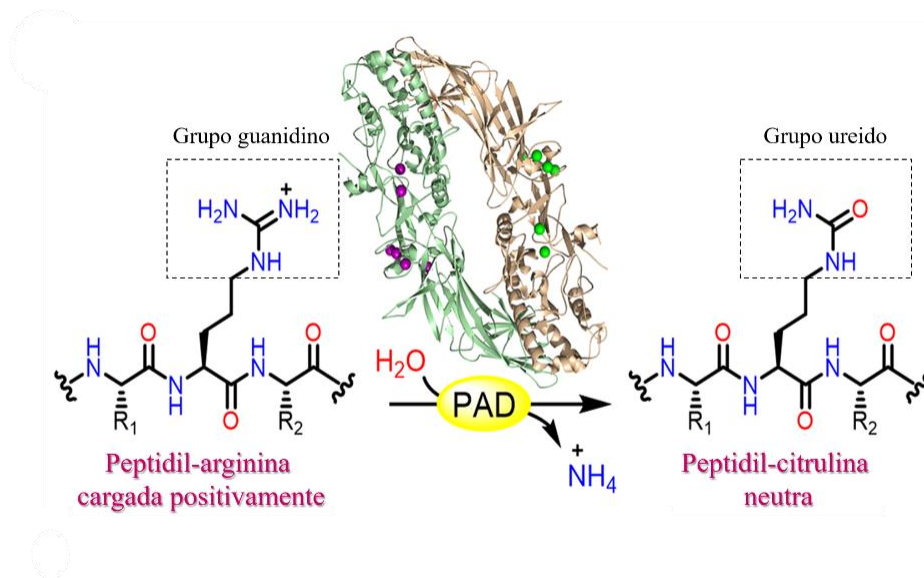


Figura 2.8: Mecanismo químico de la citrulinación de proteínas. Adaptada de *Acc Chem Res.* 2019, Mondal et al. [188].

Durante esta reacción, la pérdida de la carga positiva puede influir en los enlaces de hidrógeno y la interacción iónica y, por lo tanto, interferir con la estructura proteica organizada, lo que lleva a la desestabilización o incluso a la supresión de las interacciones inter e intramoleculares afectando su función y vida media.

Este proceso es Ca^{2+} dependiente, y requiere de altas concentraciones para la activación de PADs, un mecanismo fisiológico son las vías de señalización de la apoptosis, en las cuales, los niveles de Ca^{2+} intracelular son muy superiores al estado basal y culminan en la activación de PADs [185].

Por el contrario, la citrulinación también se presenta en una amplia gama de tejidos inflamatorios, lo que confirma que es un proceso asociado a la inflamación que generalmente, debe ser tolerado por el SI [189]. Ahora bien, existen cinco isoformas de PADs humanas, pero PAD2 y PAD4 se han implicado en la AR debido a su presencia en células inmunes y tejido sinovial [21,22]. Por un lado, PAD4 citrulina proteínas a través de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que son importantes para las respuestas antimicrobianas, pero también aumentan en la AR, lo que estimula las respuestas autoinmunes.

Por otro lado, PAD2 no es necesaria para la formación de NET, pero sí para la citrulinación articular. Adicionalmente, se ha sugerido que las trampas extracelulares de macrófagos (MET) contribuyen al conjunto de antígenos citrulinados dependientes de PAD2 y PAD4 [190-194]. Finalmente, los efectos de la actividad de PADs se han explorado mediante espectrometría de masas de alta resolución, lo que facilita la detección precisa de la citrulinación de residuos, y con los datos ómicos actuales se han podido proporcionar los patrones de expresión de las isoformas de PADs, incluidos sus sustratos.

Así pues, tan pronto se activan las PADs, comienzan a citrulinar numerosas proteínas, que incluyen α -enolasa, fibronectina, vimentina, fibrinógeno, filagrina, colágeno tipo II (CII), entre otras, estas pueden ser propensas a la citrulinación en las articulaciones. Dicho esto, la citrulinación aberrante puede crear neoepítopos citrulinados que generan autoinmunidad y pueden inducir defectos conformacionales que dañan las estructuras tisulares y provocan hiperinflamación (Figura 2.9) [188,189,195].

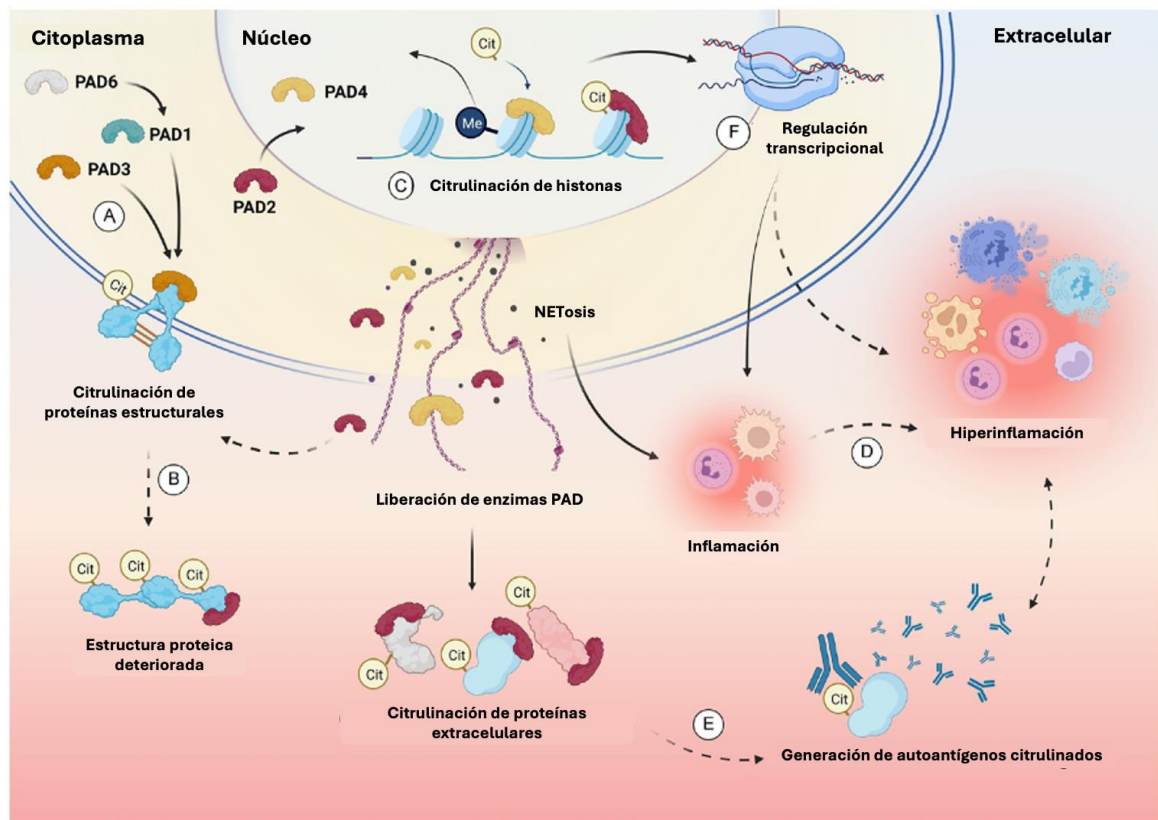


Figura 2.9: Citrulinación de proteínas celulares y de matriz extracelular. Adaptada de *Trends Cell Biol.* 2022, Yu & Proost. [189].

Como consecuencia, la presentación de los diversos péptidos citrulinados por parte de las CPA estimula los linfocitos T autorreactivos vírgenes, Th1, Th17 y Th2; los Th1 provocan la activación de los macrófagos en la articulación sinovial mediante la secreción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF, Tumor necrosis factor por sus siglas en inglés) proinflamatorio. A su vez, Th17 produce IL-17, IL-1 y TNF- α , que afectan a los condrocitos, osteoclastos y fibroblastos y, por consiguiente, los condrocitos producen enzimas degradantes de colágeno y metaloproteinasas de matriz (MPM), de igual manera, los fibroblastos se transforman en fibroblastos similares a sinoviocitos (FLS, Fibroblast-Like Synoviocytes por sus siglas en inglés), que producen citocinas proinflamatorias conduciendo a la destrucción de la matriz extracelular (MEC).

De esta manera, los linfocitos T autorreactivos estimulan a las células B autorreactivas para que produzcan ACPAs. Así pues, los Autoanticuerpos (AuAbs) pueden unirse a neutrófilos y macrófagos y provocar la formación de pannus y daño al cartílago. También pueden formar un complejo inmunológico que provoca dolor en las articulaciones y destrucción ósea (Figura 2.10). Además de las modificaciones postraduccionales como la citrulinación, otros descubrimientos recientes en la patogénesis de la AR involucran modificaciones epigenéticas, glicosilación y autofagia [185].

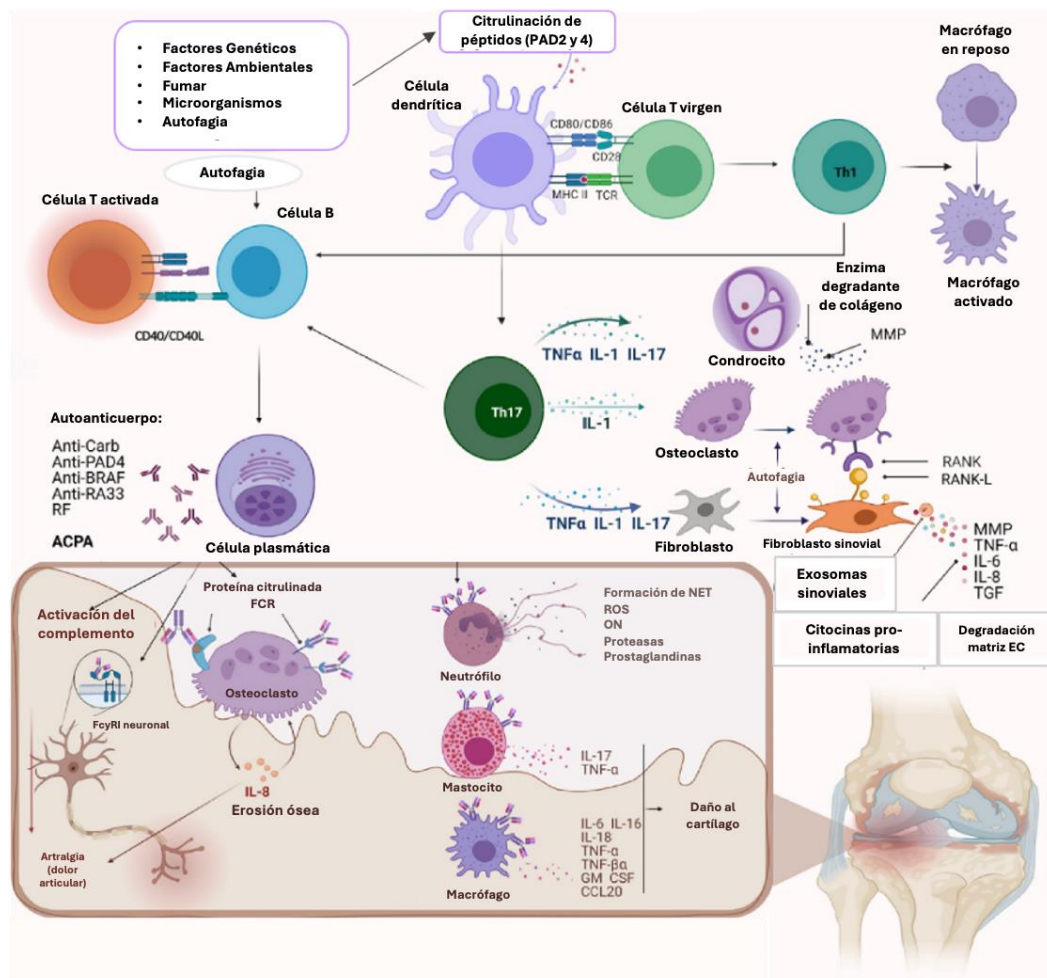


Figura 2.10: Fisiopatología de la Artritis Reumatoide. Adaptada de *Cell*, 2021. Mueller et al. [185].

2.9.2.2. *Autoanticuerpos implicados en la patogénesis y el desarrollo de la AR.*

Los anticuerpos del FR interactúan con la región Fc (Fragmento cristalizante) de la Inmunoglobulina tipo G (IgG) acumulada en la membrana sinovial inflamada, y podrían inducir localmente complejos inmunes en los sitios inflamatorios sinoviales, lo que podría ir seguido de la activación del complemento y la infiltración de leucocitos. Tienen una sensibilidad del 60 al 90% y una especificidad del 48 al 92% en pacientes con AR establecida, pero están presentes con menos frecuencia en la AR temprana (<50%). A saber, el isotipo de Inmunoglobulina tipo M (IgM) del FR de baja afinidad se produce por moléculas microbianas como LPS. Dicho esto, los isotipos en AR comienzan con IgM, seguida de IgA y, finalmente, de IgG y pueden estar presentes en etapa preclínica.

Un título alto indica pronóstico desfavorable, mayor actividad con daño articular más hostil, tasas de remisión disminuidas, mayor prevalencia de manifestaciones extraarticulares y aumento en la morbilidad [185,196].

2.9.2.3. *Anticuerpos Anti-Proteínas Citrulinadas (ACPAs)*

La respuesta de ACPAs comienza desde la especificidad fina y la propagación del epítipo, hasta el aumento del título y la alteración del isotipo comenzando con IgM, IgA y finalmente IgG por lo que se detectan niveles elevados de IgM e IgA en aproximadamente el 60% de los pacientes. El proceso continúa con la elaboración de la diversidad estructural de Abs y, en consecuencia, podría conducir a la activación de más procedimientos efectores inmunitarios. Por consiguiente, se pueden producir AuAbs tras la exposición de péptidos citrulinados en personas predispuestas genéticamente y, de acuerdo con su especificidad, se pueden dividir en dos clases [185].

Los ACPAs “promiscuos” que son específicos solo para la cadena lateral de citrulina pero pueden interactuar con múltiples epítipos siempre y cuando no haya otra cadena lateral circundante que pueda inhibir la interacción.

Estos predominan en suero antes y después del inicio de AR, sin embargo, hasta el momento no se ha identificado ninguna bioactividad patógena. Por otro lado, los ACPAs “privados” que interactúan con la cadena lateral de citrulina y son altamente específicos, reconocen la citrulina de forma similar a la identificación de la cadena lateral de aminoácidos proximales que facilita la interacción, contribuyen al reconocimiento específico de epítomos citrulinados de proteínas articulares, lo que indica que son artritogénicos.

Cabe señalar que en pacientes negativos a ACPAs, se han observado otros autoanticuerpos, incluido anti-proteínas carbamiladas, anti-malondialdehído, Anti-BRAF, anti-CarP, anti-Sa, y anti PAD3/PAD4 [185].

2.9.3. Diagnóstico y tratamiento de la AR

La Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR, European League against Rheumatism por sus siglas en inglés) y el Colegio Americano de Reumatología (ACR, American College of Rheumatology por sus siglas en inglés), sugieren realizar la puntuación de actividad de la enfermedad (DAS-28, Disease Activity Score y SDAI, Simplified Disease Activity Index, por sus siglas en inglés) que incluye la evaluación del número de articulaciones afectadas, nivel de marcadores de inflamación aguda y puntuación de bienestar general [183] (Tabla 2.2). Aunado a ello, la serología FR y ACPAs se determinan de forma rutinaria como marcadores séricos que clasifican al grupo seropositivo con una sensibilidad >80% y una especificidad del 98%. Adicionalmente, se ha demostrado que el isotipo IgA de ACPAs es detectable antes del inicio de la AR y alrededor de un tercio de pacientes seronegativos forman ACPAs de isotipo IgA [196-198].

Tabla 2.2: Criterios de clasificación del ACR/EULAR.

A. Participación articular	
1 articulación grande	0
2-10 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas (c/s afectación de AG)	2
4-10 articulaciones pequeñas (c/s afectación de AG)	3
> 10 articulaciones (al menos una pequeña)	5
B. Serología	
FR (-) y CCP (-)	0
FR (+ bajo) o CCP (+ bajo)	2
FR (+ alto) o CCP (+ alto)	3
C. Reactantes de fase aguda	
PCR normal y VSG normal	0
PCR anormal o VSG anormal	1
D. Duración de los síntomas	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1

Por su parte, los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, piroxicam, diclofenaco y celecoxib, se utilizan como terapia sintomática. No obstante, los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) son un conjunto heterogéneo de agentes que representan la base del tratamiento de la AR [199], estos se pueden clasificar como sintéticos convencionales (FAMEsc), como el metotrexato, sulfasalazina, leflunomida e hidroxicloroquina; sintéticos dirigidos (FAMEsd) como tofacitinib y baricitinib; y biológicos (FAMEb) como adalimumab, tocilizumab, secukinumab, abatacept y anakinra. Así pues, el metotrexato representa el FAMEcs de primera elección y en caso de contraindicación se utiliza leflunomida o sulfasalazina.

Por el contrario, en pacientes que no responden al tratamiento, o con mal pronóstico, se recomienda añadir un FAMEb o un FAMEsd. Finalmente, los esteroides, aunque eficaces para reducir el dolor, se utilizan como complemento debido a sus efectos secundarios y solo de forma temporal [200].

Debido a que algunos pacientes experimentan una mejoría cuando son tratados con antibióticos, se han sumado esfuerzos para dilucidar el vínculo entre la AR y los microorganismos infecciosos [201].

2.9.4. Implicaciones del microbioma humano en AR

Se ha documentado que la AR puede originarse en mucosas, incluidos el intestino y la cavidad bucal [23] y los mecanismos que vinculan a la microbiota con la AR, incluyen DI, PI, TM y citrulinación de péptidos, que se correlacionan con la actividad de la enfermedad. La DI en pacientes con AR se caracteriza por la pérdida de Bacteroidetes con un crecimiento excesivo de *Prevotella copri* (*P. copri*) en el intestino, y también en pacientes tratados con metotrexato. Este fenómeno es especialmente común en pacientes que portan el "epítipo compartido" [202-207]. Otros microbios específicos como *Collinsella* y *Eggerthella* forman parte del perfil microbiano de AR [18].

Así pues, se conoce que la DI está asociada al aumento de PI en pacientes con AR; en primer lugar, se observa acortamiento de vellosidades y lesiones del colon, incluso, en las primeras etapas de la enfermedad, en segunda instancia, presentan proteínas de TJ alteradas, y, además, la inflamación de las mucosas y respuestas inmunes también se hacen presentes. Finalmente, se han reportado biomarcadores séricos aumentados, encontrando asociación con la actividad de la enfermedad que sugiere una conexión con la inflamación sistémica. Al mismo tiempo, se menciona que esto facilita la citrulinación de péptidos, ya que permite la TM y sus enzimas [17,18], sin embargo, el papel molecular aún no está claro.

Por su parte, los estudios *in vitro* y en animales demostraron la relación entre la fuga y translocación de microbios, encontrando bacterias, DNA y/o fragmentos de pared celular en membrana sinovial y los estudios moleculares han evidenciado que las bacterias pueden migrar a la periferia y contribuir a la inflamación sinovial. Esto sugiere que la migración a las articulaciones es a través del sistema sanguíneo (p. ej., CD) y utilizan apéndices de fimbrias para invadir los fibroblastos.

Otros estudios *in vitro* han encontrado expresión de proteínas proinflamatorias como IL-6 en fibroblastos sinoviales en presencia de bacterias [202-204]. Por otro lado, se ha demostrado que la filamina A y la N-acetilglucosamina-6-sulfatasa son idénticas a los epítomos generados por *Prevotella* [204]. Otro dato que respalda la aseveración anterior es la asociación de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) que es importante en Reumatología debido a la capacidad de su enzima homóloga de PADs (llamada pPAD) para la citrulinación de péptidos potencialmente artritogénicos [25].

La enzima pPAD, es una agmatina deiminasa y no está relacionada genéticamente con las PADs eucarióticas, sin embargo, está relacionada evolutivamente con PAD2 y PAD4 humanas ya que catalizan la misma reacción química, y estructuralmente, es un pariente cercano de las ADs, una forma extendida de L-arginina deiminasas [208,209].

2.10. Homólogos de PADs/ADs (Hs-PADs/ADs)

Las enzimas ADs se conservan en una variedad de bacterias y hongos, donde desempeñan un papel importante en el metabolismo de la arginina y en la adaptación a su entorno, en respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Contienen un dominio PAD catalítico (PAD_C) distante, pero carecen de otros dominios que tienen las PADs de mamíferos, poseen una secuencia muy divergente y diferentes especificidades de sustrato.

Por su parte, la vía ADs proporciona energía en condiciones anaeróbicas y de manera similar, la L-arginina que es una molécula esencial en la formación de biopelículas, es catalizada por ADs y convertida en L-citrulina, luego se siguen pasos de conversión metabólica que finalizan con la producción de Trifosfato de Adenosina (ATP, Adenosine Triphosphate por sus siglas en inglés), amoníaco y dióxido de carbono (CO₂). Esta reacción es una desaminación en la que se elimina un grupo amino (NH₂) de la L-arginina para convertirse en L-citrulina (Figura 2.11) [28].

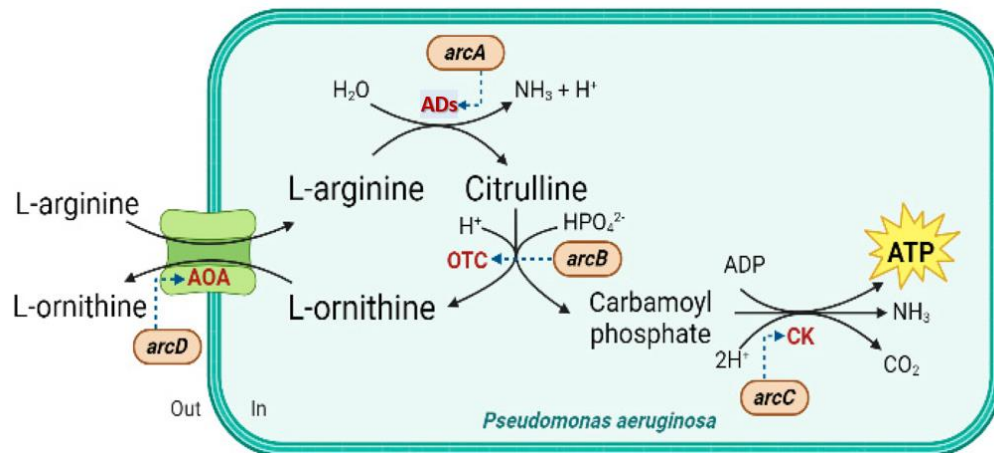


Figura 2.11: Esquema de la vía de las Arginina Deimininasas. Adaptada de *Int. J. Mol. Sci.*, 2023. Weawsiangsang et al. [28]. AOA, antiportador arginina/ornitina; ADS, arginina deiminasa; OTC, ornitina transcarbamilasa; CK, carbamato quinasa.

Por otro lado, las PADs se encuentran en menos del 1% de especies bacterianas y son más prevalentes dentro de las cianobacterias (se encuentran en el 11% de cianobacterias). Interesantemente, ningún eucariota que diverja antes de opisthokonta tiene un homólogo PADs detectable [29]. Finalmente, otro factor involucrado en la patogénesis de la AR es la vía de señalización Óxido Nítrico Sintasa/Óxido Nítrico (NOS/NO, Nitric oxide synthase/Nitric oxide por sus siglas en inglés).

2.11. Vía de señalización NOS/NO y citrulinación microbiana.

Estudios recientes han documentado, que las vías de señalización NOS/NO desempeñan un papel clave en la patogénesis de la AR, donde la sobreproducción de NO puede inducir la generación y liberación de citocinas inflamatorias y actuar como gas de radicales libres para acumularse y desencadenar estrés oxidativo [210]. Por su parte, el NO en bacterias y hongos participa como molécula de señalización en la regulación del crecimiento, desarrollo, estrés abiótico, metabolismo y en la regulación de la virulencia; el mecanismo más frecuente para su biosíntesis es la oxidación del aminoácido L-Arginina que se oxida y se convierte en L-Citrulina y NO a través de la NOS.

En varios hongos, la producción de NO se produce solo en condiciones de estrés [211]. Hipotéticamente, la MI y las enzimas microbianas pueden influir en la citrulinación de proteínas con las consiguientes respuestas inmunes en la AR a los péptidos citrulinados [18]. Sin embargo, la evidencia que existe hasta el momento se limita a unos cuantos microorganismos (*P. gingivalis*, *E. coli*, *Eggerthella* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). De hecho, los sujetos con AR pueden portar niveles elevados de aminoácidos de citrulina y/o péptidos citrulinados. Cabe mencionar que otras moléculas microbianas también podrían provocar hipercitrulinación, como la ornitina de *Eggerthella* [212] y otras moléculas de *Aa* [213] que también son microbios asociados.

Es importante mencionar que los citrulinomas microbianos han sido poco explorados y solo se restringen a *P. gingivalis* y *E. coli*, cuyos antígenos citrulinados, han sido descritos [27,214]. No obstante, la influencia de citrulinomas microbianos en el desarrollo o exacerbación de la enfermedad también es limitada y los mecanismos de migración microbiana a las articulaciones se atribuyen a un aumento en la PI.

CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La AR afecta al 1% de la población general, causa inflamación, dolor, destrucción del cartílago y erosión del hueso, su aparición se ha asociado con disbiosis microbiana y permeabilidad intestinal, sin embargo, los mecanismos moleculares que los vincula, no han sido dilucidados, y en vista de la limitada evidencia experimental sobre homólogos de las moléculas fisiopatológicas implicadas en la enfermedad, como son las PADs y antígenos citrulinados, así como pocos estudios sobre PI en pacientes que la padecen, es factible formular las siguientes preguntas: ¿Miembros de la microbiota humana poseen homólogos de PADs/ADs y citrulinomas?, ¿Los ACPAs de pacientes con AR son reactivos a antígenos microbianos?, ¿Los pacientes con AR presentan aumento en la permeabilidad intestinal?. Por lo tanto, evaluar la expresión de homólogos de PADs/ADs y citrulinomas en miembros de la microbiota humana, y determinar ACPAs microbianos y AbsZON en pacientes con AR, permitirá ampliar el conocimiento sobre el papel patogénico molecular que desempeña el microbioma humano y la permeabilidad intestinal en la patogénesis de la AR, también contribuirá a conocer sus implicaciones clínicas y al desarrollo de nuevas terapias.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Miembros de la microbiota humana albergan homólogos de PADs/ADs y antígenos endógenamente citrulinados reactivos a ACPAs de pacientes con AR, positivos para AbsZON.

Tabla 4.1. Operacionalización de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL
ACPAs	Anticuerpos contra proteínas autólogas citrulinadas en pacientes AR	Evaluación en suero por ELISA
FR	Anticuerpos IgG unidos a IgM en pacientes AR	Evaluación en suero por aglutinación en placa
VSG	Velocidad de sedimentación globular que indica actividad inflamatoria	Evaluación en sangre por Wintrobe
*PADs/ADs microbianas	Enzimas Peptidil Arginina Deimasas/Arginina Deimasas expresadas en microbiota	Evaluación en m.o. por Western blot
*Citrulinomas microbianos	Antígenos citrulinados expresados en microbiota	Evaluación en m.o. por Western blot
*ACPAs microbianos	Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas de pacientes AR con especificidad microbiana	Evaluación en suero por Western blot
*AbsZON	Anticuerpos contra Zonulina que indica permeabilidad intestinal	Evaluación en suero por ELISA competitivo

*Variable dependiente

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la expresión de Hs-PADs/ADs y AgCIT en miembros de la microbiota humana, y determinar los niveles séricos de ACPAs microbianos y AbsZON de pacientes con AR.

5.2. Objetivos particulares

1. Aislar y caracterizar especies microbianas.
2. Realizar cultivos y obtener extractos microbianos.
3. Cuantificar, separar y transferir proteínas microbianas.
4. Determinar la expresión de Hs-PAD2/PAD4 y AgCIT en extractos microbianos.
5. Determinar la actividad de citrulinación en cultivos microbianos.
6. Formar grupos de estudio de pacientes AR y controles y determinar biomarcadores de AR.
7. Determinar la reactividad antimicrobiana y el isotipo de Inmunoglobulina reactivo.
8. Obtener ACPAs de afinidad de sueros AR y determinar su reactividad frente a AgCIT-M.
9. Determinar AbsZON.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño de investigación

6.1.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio de casos y controles no pareado. Se realizó de acuerdo con los principios éticos de la Asociación Médica Mundial y con base en la Declaración de Helsinki de 2013; fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General “Dr. José Haro Ávila”, Fresnillo, Zac (HGF001/08/23).

6.1.2. Población y muestra

Se evaluaron 20 individuos procedentes del estado de Zacatecas: 10 casos con diagnóstico de AR, según los criterios de clasificación del ACR/EULAR que acudieron a consulta ambulatoria público/privada (9 mujeres y 1 hombre, con una edad promedio de 50 ± 14 años) fueron comparados con y 10 controles de tipo vecindario (6 mujeres y 4 hombres, con una edad promedio de 25 ± 5 años) a quienes se les invitó e informó la finalidad de participar en el estudio.

6.1.3. Criterios de inclusión

Se incluyeron en el grupo de los casos (AR), pacientes evaluados por un Reumatólogo que tuvieran el diagnóstico según los criterios de clasificación del ACR/EULAR 2010 y acudieran a exámenes de laboratorio en el departamento de Inmunología y Biología Molecular, UACB, UAZ, y en el grupo de los controles, se incluyeron individuos sanos sin AR. Ambos grupos incluidos en este estudio firmaron un consentimiento informado.

6.1.4. Criterios de exclusión y eliminación

Se excluyeron los individuos que retiraron el consentimiento informado antes o durante el estudio y se eliminaron aquellos cuyas muestras serológicas fueron hemolizadas.

6.1.5. Material biológico

6.1.5.1. Suero

Se obtuvieron muestras serológicas mediante venopunción de los casos (AR n=10) y controles (n=10), para la medición de biomarcadores de AR, reactividad antimicrobiana y biomarcadores de permeabilidad intestinal. Se realizó extracción de sangre venosa, la cual se colectó en tubos sin ningún tipo de anticoagulante. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1,500 rpm durante 15 minutos y se almacenaron a -20°C en el Biobanco de los Laboratorios de Inmunología y Biología Molecular, UACB, UAZ hasta su uso. Las muestras se manipularon solamente con objetivo científico.

6.1.5.2. Cepas microbianas

Se emplearon 17 especies microbianas, algunas se obtuvieron de aislados clínicos en el Hospital General de Fresnillo, Zac. y fueron proporcionadas por el Laboratorio microbiano del mismo hospital, otras son cepas de referencia tipo ATCC procedentes del cepario microbiano del Laboratorio de Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, UAZ. Las especies microbianas sirvieron como fuentes antigénicas para evaluar los objetivos microbianos y su posterior reactividad con los grupos de estudio.

6.2. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo de aislamiento y transporte. Todos los medios tienen instrucciones de preparación por el respectivo fabricante.

6.2.1. Agar sangre.

Se disolvieron 40 g del medio deshidratado en 1L de agua destilada, se dejó reposando de 5 a 10 minutos (min), después de hervir durante 1 min, se esterilizó a 121°C (15 libras de presión) durante 15 min, posteriormente se dejó enfriar a 45-50°C para vaciar en cajas Petri estériles y finalmente conservar a 4°C.

6.2.2. Agar Biggy.

Se suspendieron 11 g del medio en 250 mL de agua destilada, se calentó con agitación suave hasta completar la disolución del polvo y se hirvió durante 1 min cuidando de no sobrecalentar; se enfrió y conservó como se describió anteriormente.

6.2.3. Agar manitol salado.

Se suspendieron 56 g del medio en 500 mL de agua destilada, se calentó con agitación suave hasta completar dilución del polvo y se hirvió durante 1 min, se esterilizó a 121°C durante 15 min; se enfrió y conservó como se describió anteriormente.

6.2.4. Agar MacConkey.

Se suspendieron 25 g del medio en 500 mL de agua destilada, se calentó con agitación suave hasta la completa dilución del polvo y se hirvió durante 1 min, se esterilizó a 121°C durante 15 min, se enfrió y conservó como se describió anteriormente.

6.2.5. Medio Stuart.

Para el medio de transporte se rehidrataron 4 g del medio en 250 mL de agua destilada, se calentó hasta el punto de ebullición para disolverlo por completo, se esterilizó y distribuyó en tubos estériles; se enfrió y conservó como se describió anteriormente.

6.3. Aislamiento de especies microbianas según su origen

6.3.1. Aislados clínicos.

La obtención de los aislados clínicos fue realizada por profesionales de la salud, se obtuvieron muestras de heridas quirúrgicas (77.7% de abdomen, 18.6% de extremidades y 3.7% de tórax), sangre y materia fecal de pacientes internados en el hospital, éstas fueron colocadas en medio de transporte Stuart y enviadas al laboratorio de Bacteriología dentro del

HGF. Las muestras se registraron en libros destinados a los distintos tipos de cultivo (bacteriológico y/o hematológico).

Se rotularon cajas Petri con folio, fecha y tipo de cultivo dado en recepción para identificar cada muestra. Se flamearon pinzas para posteriormente sacar el hisopo del tubo Stuart. Se inoculó muestra en los medios agar sangre, MacConkey, manitol salado y Biggy dando movimientos suaves para evitar rompimiento del medio. Se flameó asa de siembra hasta rojo vivo para esterilizar, se quemó en una orilla de caja Petri y continuó con el estriado del medio. Se llevó a incubadora con temperatura de 36°C, en el caso del agar sangre se colocó primero en la cámara anaeróbica y posteriormente en incubadora.

6.3.2. Aislados alimentarios.

Para el aislamiento de *L. casei* se preparó una dilución primaria del alimento BIO-4, permitiendo una distribución uniforme de los microorganismos contenidos en la muestra, según lo establecido en la norma (NOM-110-SSA1, 1994). Preparación y dilución de muestras de alimentos. Se pesaron 10 gr del alimento y se diluyeron en 90 mL de solución de fosfatos; se dejó reposar 1 h y se tomó 1 mL de la solución, enviando a caldo MRS por 48 h, transcurrido el tiempo se sembró en agar MRS tomando una asada para su siembra por estría cerrada. La levadura de pan se empleó para aislar a *S. cerevisiae*. Se disolvió 1 g de levadura de pan en 100 mL de PBS 1X y se centrifugó a 1,500 rpm, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió nuevamente en 100 mL de PBS 1X para posteriormente tomar un asa y estriar en cajas Petri, con agar MH y finalmente se incubó a 25°C durante 48 h.

6.4. Identificación de especies microbianas

Posterior a la incubación se identificaron las bacterias Gram positivas y Gram negativas; para esto, se colocaron tubos de ensayo en casets previamente rotulados para identificación, se agregaron 3 mL de solución salina estéril; se tomaron dos tubos por cultivo, uno para realizar dilución y otro para el blanco. Se tomó aplicador estéril para facilitar la toma de colonias de bacterias y así preparar diluciones en tubos de ensayo con movimientos

circulares hasta disolver colonias en la solución salina. Se colocó el tubo de ensayo en nefelómetro para conocer la turbidez de la dilución.

Para bacterias Gram negativas la turbidez debe indicar un valor entre 5.5-6 (6×10^8 UFC/mL), mientras que para bacterias Gram positivas debe indicar un valor de 6.5-7 (7×10^8 UFC/mL). Posteriormente, se identificaron cajas Petri, se abrió tubo de ensayo y se tomó hisopo con pinzas para inocular muestra; con asa estéril se estriaron los medios de cultivo de aislamiento, posteriormente, se incubó a 36°C. Después se tomó micropipeta para Gram negativa o Gram positiva dependiendo el caso y realizó pase al blanco, mezclando con tres succiones. Cada micropipeta indica cantidad diferente, para Gram negativa son 145 μ L y para Gram positiva 280 μ L.

Finalmente, se colocó tarjetas GP y AST-GP75 (para bacterias Gram positivas) o GN y AST-GN271 (para bacterias Gram negativas) y se colocó caset para dar inicio al proceso. La caracterización bioquímica de los aislados se realizó mediante el equipo VITEK® 2 Compact de la empresa bioMérieux en el HGF.

6.5. Cultivos microbianos

Para la resiembra, los microorganismos fueron colocados en caldos nutritivos a 37°C por 24 h. Se realizó la siembra por estría cerrada en cajas Petri en agar sólido correspondiente a cada microorganismo y se incubaron por 48 h a 37°C (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Cepas microbianas empleadas en el estudio.

n	Fila	Género	Especie	Origen	Agar
1	Firmicutes	Lacticaseibacillus	<i>L. casei</i>	Alimento	MRS
2		Enterococcus	<i>E. faecalis</i>	Aislado clínico	MacConkey
3		Staphylococcus	<i>S. epidermidis</i>	Aislado clínico	Mannitol salado
4		Staphylococcus	<i>S. aureus</i>	CR-ATCC 25923	Mannitol salado
5	Proteobacteria	Proteus	<i>P. mirabilis</i>	Aislado clínico	MacConkey
6		Proteus	<i>P. vulgaris</i>	Aislado clínico	MacConkey
7		Escherichia	<i>E. coli</i>	CR-ATCC 25922	MacConkey
8		Klebsiella	<i>K. pneumoniae</i>	Aislado clínico	MacConkey
9		Klebsiella	<i>K. oxytoca</i>	Aislado clínico	MacConkey
10		Citrobacter	<i>C. freundii</i>	Aislado clínico	MacConkey
11		Morganella	<i>M. morganii</i>	Aislado clínico	MacConkey
12		Pseudomonas	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico	Agar sangre
13		Acinetobacter	<i>A. baumannii</i>	Aislado clínico	Agar sangre
14	Ascomycota	Cándida	<i>C. albicans</i>	Aislado clínico	CHROMagar
15		Cándida	<i>C. glabrata</i>	Aislado clínico	BIGGY
16		Cándida	<i>C. tropicalis</i>	Aislado clínico	CHROMagar
17		Saccharomyces	<i>S. cerevisiae</i>	Alimento	Papa y Dextrosa

CR = Cepa de referencia

6.6. Resiembras y conservación de microorganismos

Para viabilizar las cepas microbianas se sembraron en AMH y fueron incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente se sembraron en caldos nutritivos a 37°C por 24 h. Su conservación se realizó por medio de triplicados en tubos con AMH e inundados con aceite mineral a Tr y en congelación a -80 °C. Las réplicas se utilizaron para conservación y resiembras de trabajo.

6.7. Extracción de proteínas microbianas

6.7.1. Extracción de proteínas bacterianas.

Para la extracción de proteínas bacterianas, se colectaron 500 μL de colonias en tubo eppendorf y se realizaron 2 lavados con 500 μL de PBS 1X, después de resuspender suavemente y centrifugar a 5,000 rpm por 3 min en el equipo HERMLE® Z 323 K (centrífuga de alta velocidad universal con sistema de enfriamiento), el pellet se resuspendió en 500 μL de buffer de extracción y se adicionaron 40 μL de inhibidor de proteasas para ser incubado en hielo, posterior a la sonicación de muestras en el equipo Ultrasonic Processor GEX 130 PB con 3 ciclos de 10 segundos (s) cada uno, intercalando con 2 min de incubación en hielo a una amplitud de 60%, se centrifugaron por 15 min a 10,000 rpm a 4°C para después colocar el sobrenadante en tubos eppendorf. Finalmente, se realizaron alícuotas de 100 μL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

6.7.2. Extracción de proteínas micóticas.

Para la extracción de proteínas micóticas del género *Cándida* se colectaron en tubos eppendorf 500 μL de colonias y se realizaron 2 lavados con 500 μL de PBS 1X, después de resuspender suavemente y centrifugar a 5,000 rpm por 3 min en el equipo HERMLE® Z 323 K, el precipitado celular se maceró en mortero adicionando 500 μL de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se pasó a un tubo eppendorf y se adicionaron 500 μL de buffer de extracción más 40 μL de inhibidor de proteasas para ser incubado en hielo, posterior a la sonicación en el equipo Ultrasonic Processor GEX 130 PB con 10 ciclos de 20 seg cada uno, intercalando con 2 min de incubación en hielo a una amplitud de 60%, se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm a 4°C para después colocar el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf y se etiquetó como “Fracción de proteínas citoplásmicas”.

El precipitado se resuspendió nuevamente con 500 μL de buffer de extracción más 40 μL de inhibidor de proteasas y se identificó como “Fracción de proteínas de membrana” ambas muestras fueron almacenadas en alícuotas de 100 μL y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para obtener los extractos proteicos de *S. cerevisiae* se realizó el mismo procedimiento que en bacterias.

6.8. Cuantificación de proteínas microbianas

La cuantificación de proteínas de los extractos microbianos, se realizó por el método de Bradford, empleando una curva estándar albúmina sérica bovina (BSA, bovine serum albumin por sus siglas en inglés) a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La determinación se realizó en microplaca y se obtuvieron las lecturas de absorbancia en el Fotómetro para microplacas MultiskanTM FC Thermo ScientificTM a una longitud de onda de 595 nm. Finalmente, los valores de absorbancia fueron extrapolados a unidades de concentración.

6.9. Gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% (Tabla 6.2) y se igualaron las concentraciones de los extractos microbianos para colocar 20 μg de proteínas por carril, estas fueron diluidas en buffer de carga (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 4.4% p/v de SDS, 10% de β -mercaptoetanol, 44.4% v/v de glicerol, 0.02% de azul de bromofenol), después de exponerlas a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min se colocaron en hielo por 10 min. Se cargó el marcador de peso molecular (MW, Molecular Weight por sus siglas en inglés) Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards, #1610374 de BIO-RAD y las muestras; se realizó la separación de las proteínas bajo condiciones reductoras en cámara de electroforesis Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast Systems de BIO-RAD, se usó buffer de corrida 1X (Glicina, Tris-Base, SDS y H_2O) y se sometieron a 80 V (volts) durante 2.5 h.

Una vez que el azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel, se detuvo la corrida y posteriormente el gel se colocó en una disolución de fijado (CH₃OH 50%, CH₃COOH 10% y 40% de H₂O) por 5 min y enseguida en una disolución de teñido (Coomassie, (NH₄)₂SO₄, H₃PO₄ 85%, CH₃OH y H₂O destilada) durante 2 h, al término, se lavó con H₂O (agua destilada) hasta quitar el exceso de colorante. El agua fue retirada y se adicionó solución desteñidora por 30 min en agitación (CH₃OH 5%, CH₃COOH 7% y 88% de H₂O), finalmente, el gel se lavó con abundante H₂O hasta dejar de percibir el ácido acético.

Tabla 6.2. Preparación de gel de poliacrilamida al 10%.

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O	3.360 mL	1.525 mL
Acryl/Bis (30%)	2.350 mL	325 µL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.167 mL	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-	625 µL
SDS 10%	70 µL	25 µL
AP 10%	70 µL	25 µL
TEMED	4 µL	5 µL

6.10. Transferencia de proteínas microbianas

Después de la separación de las proteínas microbianas mediante electroforesis, los geles fueron puestos en contacto con membranas de nitrocelulosa (NITROCEL MEMB, Bio-Rad, BIO1620115, CA, EE. UU.) con el objetivo de transferir las proteínas microbianas; las condiciones de transferencia fueron de 2 h y la unión no específica de los anticuerpos se bloqueó con leche descremada al 5% diluida en PBS 1X por 2 h.

6.11. Detección de Hs-PADs/ADs por Western Blot (WB)

Las enzimas homólogas de PADs/ADs se identificaron aplicando pAbs comerciales: IgG de conejo anti-PAD2 (PA5-19474; Invitrogen; 1 µg/mL, Waltham, MA, EE. UU.) que reconoce el péptido sintético derivado de los residuos 100– 200 de PAD2 humano (Uniprot ID#Q9Y2J8, Ginebra, Suiza) e IgG de conejo anti-PAD4 (PA5-22317; Invitrogen; diluido 1:500) que reconoce un fragmento recombinante correspondiente a la región entre los aminoácidos 326 y 611 de PAD4 humano (ID de Uniprot # Q9UM07) en leche-PBS 1X al 3% durante 18 h a 4 °C y se incubaron con balanceo suave; se usó Ab secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase por sus siglas en inglés) (ab97051 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:10,000 en leche-PBS 1X al 3% e incubados durante 2 h a 4 °C en oscuridad.

Como control proteico constitutivo se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-HSP70 de Invitrogen (MA5-45208) a dilución 1:1,000 en leche-PBS al 3% incubándose durante 18 h a 4 °C con balanceo suave; el Ab secundario fue anti-ratón conjugado con HRP a una dilución 1:10,000 en leche-PBS 1X al 3% incubándose durante 2 h a 4 °C en oscuridad. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimiluminiscencia de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Clarity™ Western ECL Substrate Cat # 170-5061 BIO RAD).

6.12. Detección de Antígenos Citrulinados (AgCIT) microbianos por WB

Las proteínas citrulinadas en los extractos microbianos se detectaron mediante un anticuerpo policlonal comercial IgG anti-citrulina humana (ab100932) puesto en contacto con los antígenos microbianos contenidos en membranas, a una dilución de 1:500 en leche-PBS 1X al 3% e incubados durante 18 h a 4 °C; y un Ab secundario anti-IgG humano conjugado con HRP (ab 6858 Abcam) diluido 1:10,000 en leche-PBS 1X al 3% durante 2 h a 4 °C, incubado en oscuridad. Las bandas inmunorreactivas se detectaron y analizaron como se describió anteriormente.

6.13. Determinación de biomarcadores de AR

6.13.1. Determinación de Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)

Para medir la VSG se usó el procedimiento de Wintrobe, para ello se tomó 1 mL de sangre venosa anticoagulada con EDTA y se colocó en tubo de Wintrobe (tubo de vidrio con un diámetro de 3 milímetros (mm) y graduado en mm en una escala de 0 a 10 cm), se dejó reposar a TA durante 1 h en un soporte para mantener la posición vertical; al término, se cuantificó la sedimentación en mm desde el borde superior del plasma hasta la base del paquete globular.

6.13.2. Determinación de Factor Reumatoide (FR)

Se realizó una prueba de aglutinación de látex con el Kit LiCON RaPET FR, se agregaron 40 μ L de las muestras no diluidas de los pacientes en diferentes celdas de la placa, así como un C+ y C- en distintas celdas. Después se agregaron 40 μ L del reactivo de látex a un lado de las muestras en cada celda y posteriormente se mezclaron cubriendo toda la superficie de las celdas. Se giraron las placas manualmente por 2 min y finalmente se observó la presencia o ausencia de aglutinación. En caso de aglutinación se realizaron diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 para determinar la concentración en UI/mL.

6.13.3. Determinación de Anticuerpos Anti-Proteínas Citrulinadas (ACPAs) por ELISA

Las muestras serológicas de pacientes con AR y sueros control fueron sometidas a una prueba ELISA para la determinación de anticuerpos anti-CCP utilizando el kit comercial Euroimmun (EA 15.059.601 G). Para ello, las muestras diluidas 1:100 se colocaron en pocillos que contenían péptidos citrulinados y se incubaron durante 1 h, seguido de lavados. Se añadió el anticuerpo IgG antihumano conjugado con HRP durante 30 min; se realizaron lavados adicionales; y posteriormente se añadió el sustrato Trimetil Benzidina (TMB) durante 15 min. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.2 M y las absorbancias (ABS) se obtuvieron por espectrofotometría a 450 nm y se realizaron cálculos para obtener unidades de concentración.

6.14. Reactividad antimicrobiana de sueros AR y controles por WB

La reactividad antimicrobiana y el isotipo de Igs humana involucrada, se determinó usando los sueros de los casos (AR) y sueros de los controles sobre los antígenos microbianos contenidos en membranas, a una dilución de 1:2,000 en leche-PBS 1X al 3% durante 18 h a 4 °C incubados con balanceo suave; y los Abs secundarios anti-IgG (ab 6858 Abcam) y anti-IgA humanos (A18781 de Invitrogen) conjugados con HRP diluidos 1:10,000 en leche-PBS 1X al 3% durante 2 h a 4 °C incubados en oscuridad. Las bandas inmunorreactivas se detectaron y analizaron como se describió anteriormente.

6.15. Obtención de ACPAs de afinidad por Elución

Se empleó el suero de uno de los casos (AR), que fue positivo en la prueba de anti-CCP para obtener ACPAs de afinidad; Se utilizó una placa ELISA comercial con péptidos citrulinados (Euroimmun Kit EA 15.059.601 G) para la incubación del suero durante 1 h. Después de lavados, los anticuerpos específicos unidos a los péptidos se incubaron con glicina 0.2 M (pH 2.6) durante 18 h a 4 °C para su elución, posteriormente, fueron colectados en tubos y neutralizados con Tris Base (pH 8.6). Los ACPAs de afinidad se pusieron en contacto con antígenos microbianos en ensayos de WB.

6.16. Reactividad de ACPAs en extractos microbianos por WB

Se utilizaron los ACPAs de afinidad para evaluar la reactividad contra antígenos microbianos “citrulinados” marcados por el pAb anti-citrulina humano: para ello, fueron puestos en contacto los ACPAs de afinidad con los antígenos microbianos contenidos en membranas e incubados durante 18 h a 4 °C con balanceo suave. El Ab secundario conjugado con HRP que se empleó fue el anti-IgG (ab 6858 Abcam) diluido 1:5,000 en leche-PBS 1X al 3% durante 2 h a 4 °C incubados en oscuridad. Las bandas inmunorreactivas se detectaron y analizaron como se describió anteriormente.

6.17. Actividad de citrulinación en cultivos microbianos

La actividad de citrulinación de las especies se realizó en los cultivos con Reactivo de Griess. La producción de L-Citrulina se determinó mediante la síntesis del NO. Para lograr esto, los microorganismos se cultivaron en medio sólido, como se describió anteriormente. A las cajas de Petri correspondientes a cada especie se les añadió 1 mL de reactivo de Griess (087K5013 SIGMA, St. Louis, MO, USA); esto se dejó por 15 min para luego tomar un volumen de 300 μ L que se colocó en placa de ELISA. El cambio de color se interpretó como la producción de ON/L-Citrulina, desde un tono amarillo o marrón (dependiendo del medio sólido, agar MH o MRS) hasta un tono rosado-rojizo. La ausencia de un color rosado-rojizo fue signo de no producción de ON/L-Citrulina.

6.18. Determinación de anticuerpos anti-Zonulina (AbsZON) por ELISA

Se utilizó el kit comercial AbZON que aplica la técnica de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-C) utilizando el antígeno Zonulina y un Ab específico de Zonulina conjugado con HRP "AbZON-HRP". Los controles, calibradores y las muestras de ambos grupos de estudio (dilución 1:10-100 μ L/pozo) se incubaron junto con el conjugado AbZON-HRP (50 μ L/pozo) en la placa de micro titulación precubierta durante 1 h a 37 °C. Después se realizó decantación y 5 lavados; a continuación, los pocillos se incubaron con el sustrato TMB para la enzima HRP que formó un complejo colorido enzima-sustrato, finalmente se agregó H₂SO₄ 0.2 M para detener la reacción.

La intensidad del color se midió por espectrofotometría a 450 nm en lector de microplacas y es inversamente proporcional a la concentración de Abs contra la Zonulina (AbsZON), ya que los AbsZON de las muestras y los AbsZON-HRP compiten por los sitios de unión al antígeno. Dado que el número de sitios es limitado, a medida que AbsZON de las muestras ocupa más sitios, quedan menos sitios para unir el conjugado AbsZON-HRP. Se realizó una curva estándar que relaciona el valor de ABS con la concentración de los estándares, de manera que la concentración de AbsZON en cada muestra se interpola a partir de esta curva estándar.

6.19. Análisis de imágenes

Las imágenes de los geles fueron capturadas en el Fotodocumentador Gel Logic 212 PRO para su visualización digital, y el peso molecular de las proteínas representadas como bandas se estimó con el software Carestream MI. De igual manera, las imágenes de la reactividad del mAb y pAbs comerciales, así como de los sueros de los grupos de estudio, fueron capturadas en un generador de imágenes molecular ChemiDoc XRS (BIO-RAD) y analizadas con el software Image Lab™ 2.0 (BIO RAD).

6.20. Procesamiento de la información

Todos los datos se registraron en el programa de Microsoft Excel en tablas, que permitieron trabajar de manera ordenada, cuya disposición facilitó la obtención de datos estadísticos.

6.21. Análisis estadístico

Los datos se representaron con estadística descriptiva e inferencial. Para comparar la expresión de Hs-PAD2/PAD4 y AgCIT, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, y para comparar la reactividad de sueros, se empleó la prueba U de Mann Whitney, ambas, no paramétricas, y los datos se expresaron como medianas y rangos empleando la INT. Adicionalmente, se realizó el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre la expresión de AgCIT vs la expresión de Hs-PAD2/PAD4, y de Actividad de citrulinación, además de los niveles de AbsZON vs biomarcadores serológicos. Se consideró significancia estadística un valor de $p \leq 0.05$.

Las asociaciones entre AbsZON con AR, se evaluaron mediante Razón de Momios. Las pruebas y gráficos se generaron en los programas SPSS versión 24 y GraphPad Prism versión 8.0.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS

7.1. Los extractos microbianos muestran concentraciones de proteínas variadas.

Se presentan las concentraciones de proteínas microbianas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se aprecian marcadas variaciones en cada uno de los extractos por lo que se igualan para su corrimiento homogéneo en los geles (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Concentraciones de proteínas microbianas.

Filas microbianas	Extracto microbiano	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Proteobacteria	<i>P. mirabilis</i>	3.19
	<i>P. vulgaris</i>	2.85
	<i>E. coli</i>	4.8
	<i>K. pneumoniae</i>	3.4
	<i>K. oxytoca</i>	2.71
	<i>C. freundii</i>	5.26
	<i>M. morganii</i>	2.92
	<i>P. aeruginosa</i>	2.62
	<i>A. baumannii</i>	3.36
	<i>L. casei</i>	3.8
Firmicutes	<i>E. faecalis</i>	0.52
	<i>S. epidermidis</i>	3.82
	<i>S. aureus</i>	4.49
Ascomycota	<i>C. albicans</i>	3.96
	<i>C. glabrata</i>	3.34
	<i>C. tropicalis</i>	4
	<i>S. cerevisiae</i>	4.69

7.2. Las cepas microbianas presentan perfiles antigénicos diferidos

Se presentan los patrones electroforéticos de las 17 especies clasificadas en filas microbianas y se puede apreciar la diversidad de antígenos expresados como bandas de diferentes densidades (Figura 7.1) cuyos pesos moleculares estimados se presentan en las Tablas 7.2-7.4.

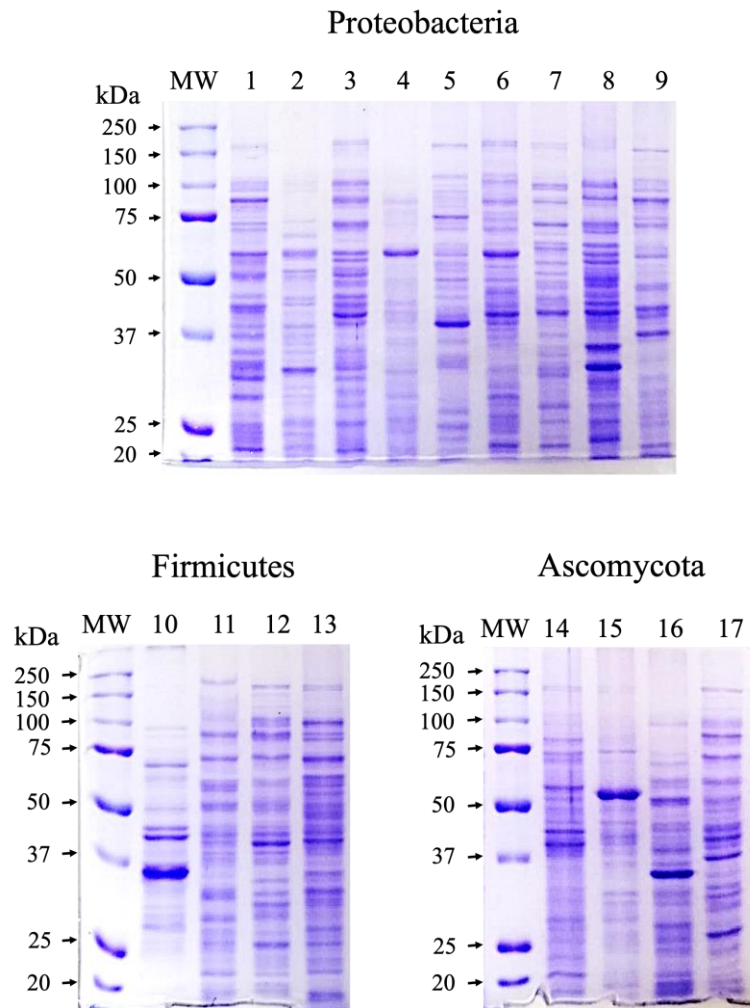


Figura 7.1: SDS-PAGE. Perfiles antígenos microbianos. La imagen muestra el patrón electroforético de las especies pertenecientes a las filas Proteobacteria: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgani*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, Firmicutes: 10. *L. casei*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, y Ascomycota: 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis*, 17. *S. cerevisiae*. MW = Peso molecular, del inglés: Molecular Weight.

Tabla 7.2. Estimación del peso molecular de proteínas del filo Proteobacteria.

No. Bandas	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>C. freundii</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa
1	191.1	190.5	193.2		192.4	191.7	193.57	183.2	189.1
2	86.33	71.83	91.43		91.56	83.93	78.93	83.21	88.43
3	70.67	60.17	72.96	83.39	86.33	70.41	69.39	58.84	87.5
4	60.5	53.5	64.97	72.41	71.67	62.76	61.05	49.91	76.43
5	53.33	43.69	51.36	67.26	54.33	52.04	55.1	46.45	72.28
6	49.62	41.52	43.92	50.42	50	47.47	51.36	43.73	59.52
7	44.91	37.75	41.49	44.74	44.63	44.48	48.5	40.93	42.33
8	41.71	35.95	34	41.58	41.71	41.58	45.79	36.9	36.7
9	39.92	33.05	32.28	34.44	37.75	34.44	43.92	35.13	32.38
10	37.75	31.32	29.28	29.11	32.42	30.11	41.77	26.77	27.11
11	32.42	23.5	24.95	25.2	23.1	28.69	39.24	24.9	25

kDa = Kilodalton

Tabla 7.3. Estimación del peso molecular de proteínas del filo Firmicutes.

No. Bandas	<i>L. casei</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
	kDa	kDa	kDa	kDa
1		192.4	193.2	193.57
2	92.19	89.06	90.61	70.83
3	72.83	74.33	75	68
4	67	64.33	63.83	53.33
5	49.81	60	57.83	44.72
6	45.86	57.33	53.83	41.71
7	43.31	51.33	47.36	39.83
8	37.38	47.55	41.52	37.78
9	35.26	45.01	39.92	35.62
10	32.95	40.2	37.57	32.63
11		37	32.59	30.84

kDa = Kilodalton

Tabla 7.4. Estimación del peso molecular de proteínas micóticas del filo Ascomycota.

No. Bandas	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	kDa	kDa	kDa	kDa
1	192.4	193.2		193.57
2	91.56	98.93	93.93	92.03
3	87.86	90.36	71.43	82.65
4	71.6	74.32	59.01	71.6
5	59.86	54.42	54.25	57.48
6	51.83	45.7	46.91	46.17
7	42.99	43.73	43.45	42.58
8	41.20	41.02	41.77	33.7
9	36.21	36.56	32.33	24.95
10	32.14	33.58	27.86	28.06
11	27.68	25.05	26.92	24.24

kDa = Kilodalton

7.3. Las proteínas microbianas se transfieren de forma homogénea.

Las membranas de nitrocelulosa teñidas con rojo de ponceau, conservan los antígenos microbianos de manera homogénea y similar a los mostrados con azul de coomassie en los geles (Figura 7.2).

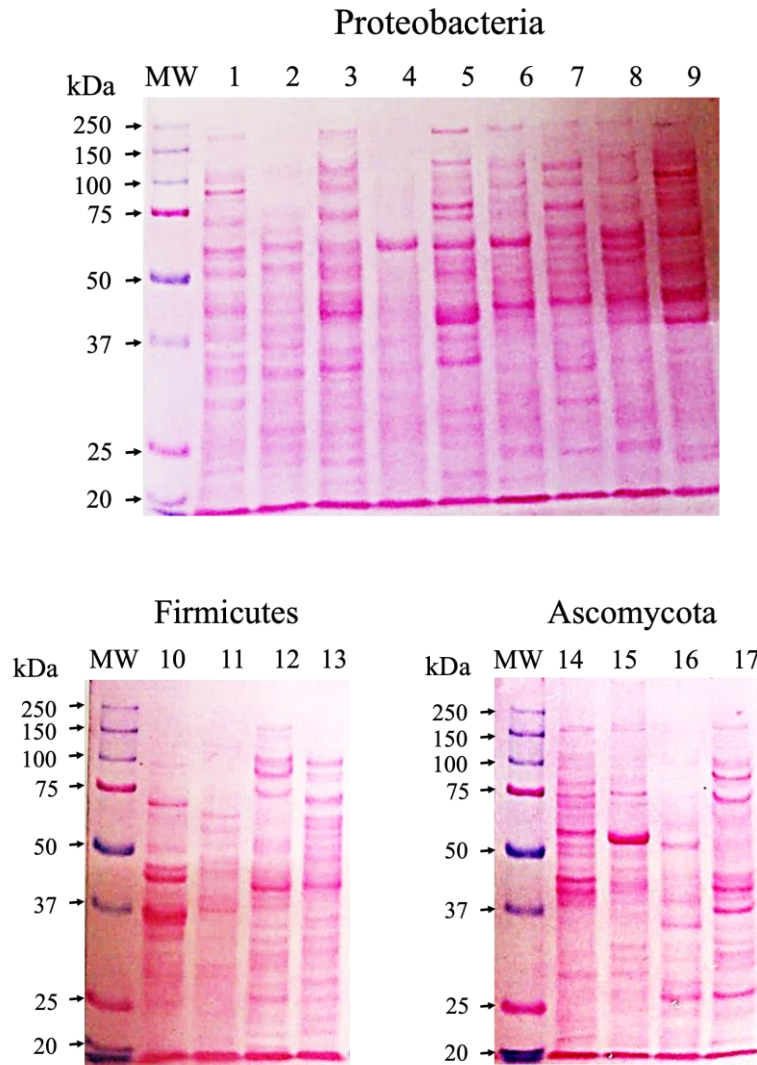


Figura 7.2: Transferencia de proteínas microbianas. La imagen muestra los antígenos microbianos transferidos a membranas de nitrocelulosa de las especies pertenecientes a las filas Proteobacteria: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgani*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, Firmicutes: 10. *L. casei*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, y Ascomycota: 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis*, 17. *S. cerevisiae*. MW = Peso molecular, del inglés: Molecular Weight.

7.4. Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PAD2.

El pAb anti-PAD2 demostró la presencia de bandas reactivas en el 78% de especies del filo Proteobacteria, con masas moleculares de ~85 kDa, ~75 kDa y ~35 kDa; el 50% de especies del filo Firmicutes (~85 kDa, ~48 kDa y ~45 kDa); y el 75% de especies del filo Ascomycota (~45 kDa). Las bandas reactivas corresponden a homólogos de PAD2 y presentan ligeras diferencias en el peso molecular en comparación con los de la enzima PAD2 humana (75 kDa). Además, los resultados sugieren que los homólogos microbianos de PAD2 son igualmente inmunogénicos porque son reconocidos por el pAb anti-PAD2 específico de humano, probablemente porque algunos dominios microbianos comparten homología con las enzimas PAD2 de los mamíferos (Figuras 7.3, 7.4).

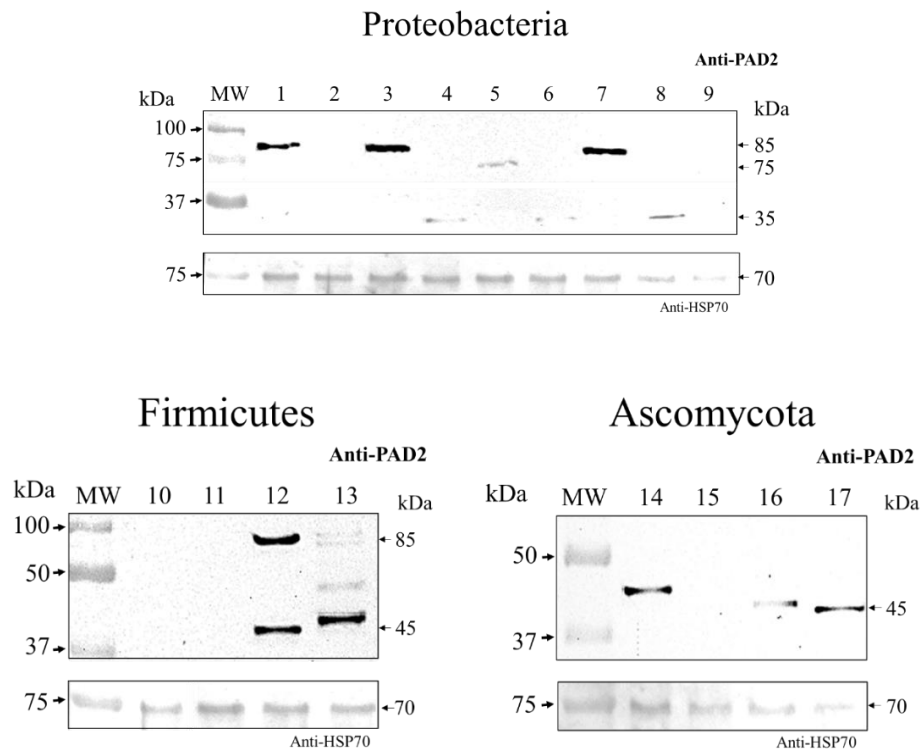


Figura 7.3: Western blot. Hs-PAD2 presentes en miembros de la microbiota. Se muestra la presencia de enzimas homólogas de PAD2 en miembros de las filas Proteobacteria: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgannii*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, Firmicutes: 10. *L. casei*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, y Ascomycota: 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis*, y 17. *S. cerevisiae*. En la parte inferior de cada blot, se muestra la expresión de la proteína constitutiva que permitió realizar la normalización.

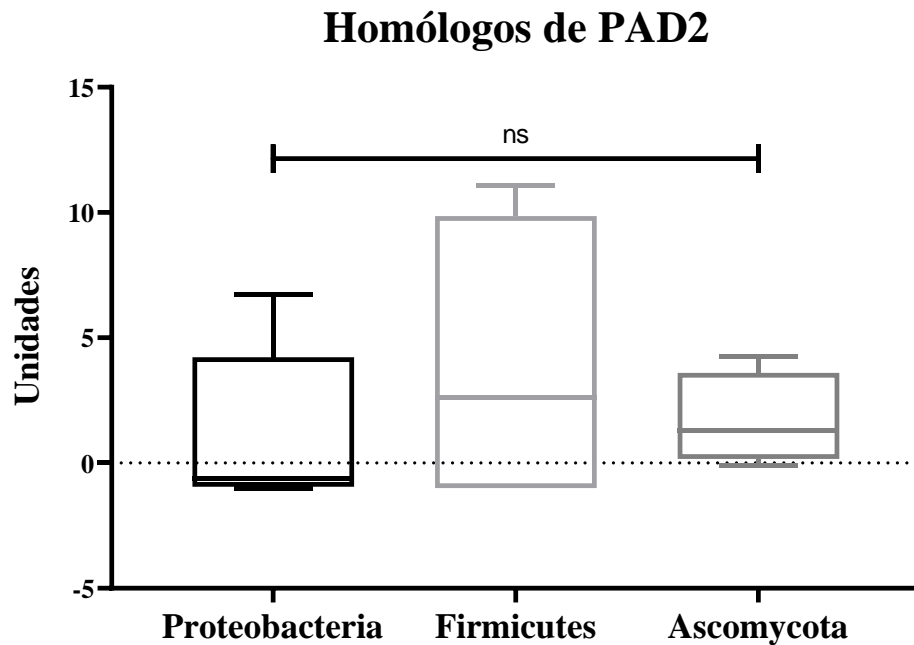


Figura 7.4: Comparación de la expresión de Hs-PAD2 en filas microbianas. Se muestra la comparación de la expresión de homólogos de PAD2 en las filas Proteobacteria, Firmicutes y Ascomycota sin encontrar diferencias, según la prueba de Kruskal-Wallis, ns = no significativo.

7.5. Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PAD4

El pAb anti-PAD4 demostró la presencia de bandas reactivas en el 56% de especies del filo Proteobacteria, con masas moleculares de ~45 kDa y ~35 kDa; el 50% de especies del filo Firmicutes (~45 kDa) y el 75% de especies del filo Ascomycota (~45 kDa). Las bandas reactivas corresponden a homólogos de PAD4 y presentan diferencias en comparación con la masa molecular de la enzima PAD4 humana (74 kDa), sin embargo, es similar al de pPAD de *P. gingivalis*, y ADs de *E. coli* y *S. aureus* (45-47 kDa).

Además, los resultados sugieren que los homólogos microbianos de PAD4/ADs también son inmunogénicos porque son reconocidos por el pAb anti-PAD4 específico de humano, probablemente porque algunos dominios microbianos comparten homología con las enzimas PAD4 de los mamíferos (Figuras 7.5, 7.6), sin embargo, falta evidencia estructural que lo respalde.

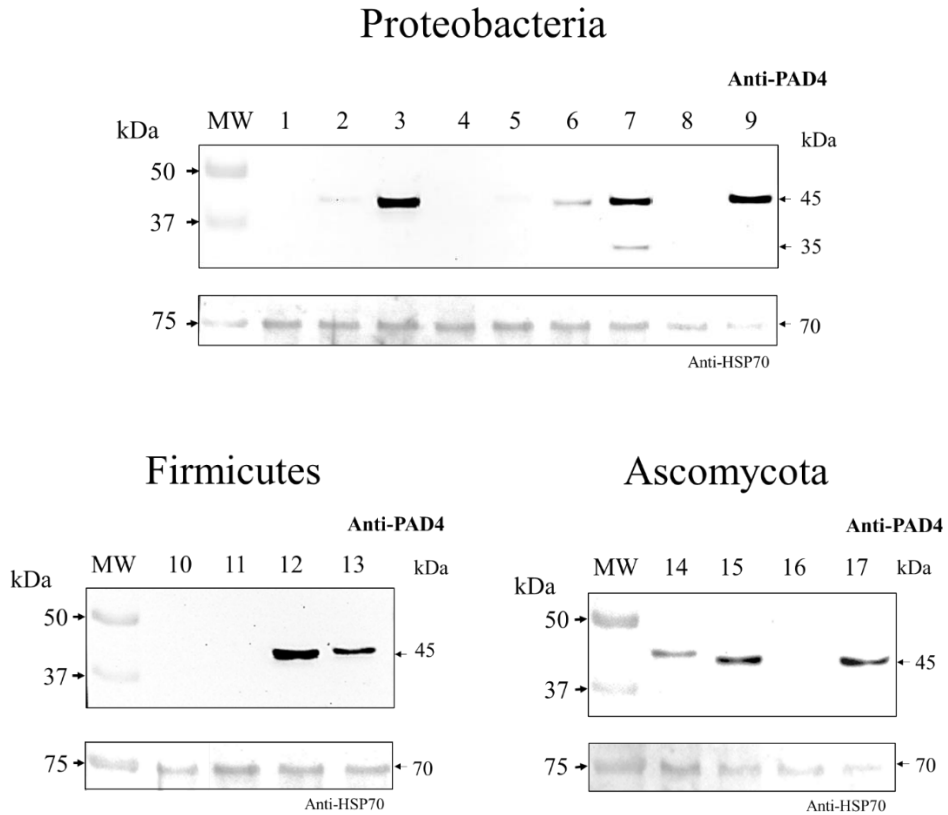


Figura 7.5: Western blot. Hs-PAD4 presentes en miembros de la microbiota. Se muestra la presencia de enzimas homólogas de PAD4 en las filas Proteobacteria: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgannii*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, Firmicutes: 10. *L. casei*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, y Ascomycota: 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis* y 17. *S. cerevisiae*. En la parte inferior de cada blot, se muestra la expresión de la proteína constitutiva.

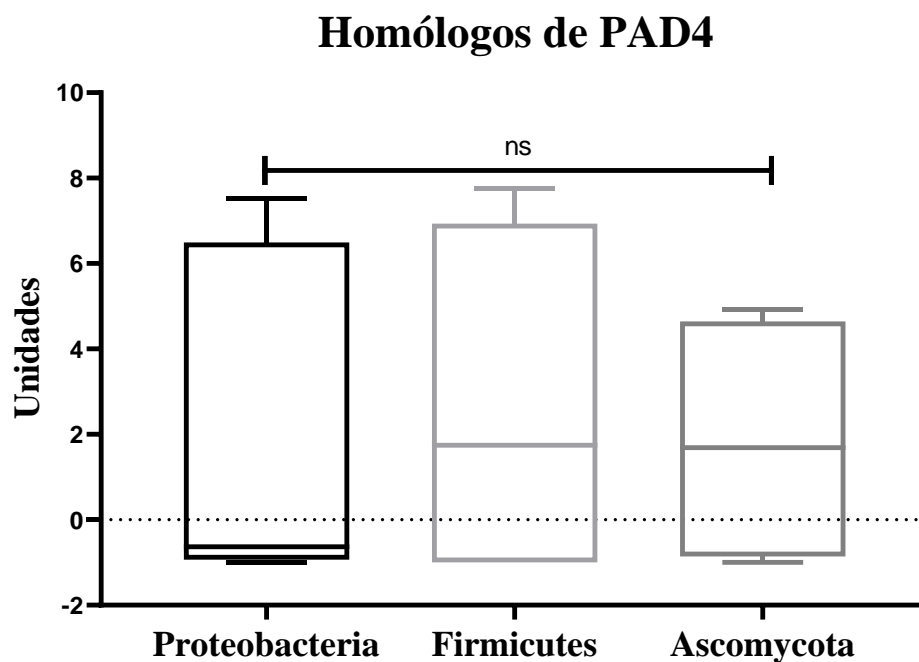
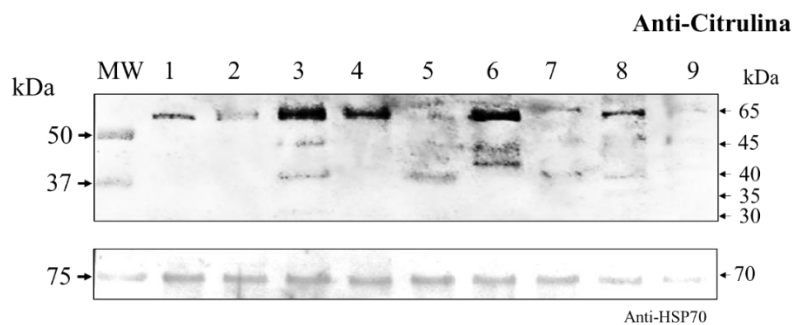


Figura 7.6: Comparación de la expresión de Hs-PAD4 en filas microbianas. Se muestra la expresión de homólogos de PAD4 en las filas Proteobacteria, Firmicutes y Ascomycota sin diferencias estadísticas, según la prueba de Kruskal-Wallis, ns = no significativo.

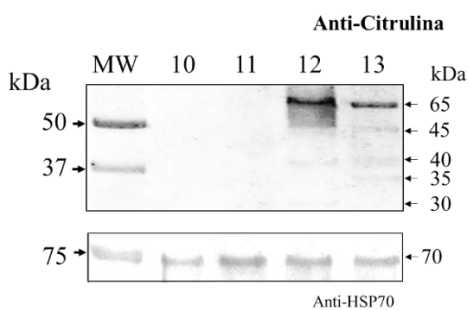
7.6. Citrulinomas microbianos están presentes en Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota.

Se demostró que el pAb anti-citrulina humano comercial reconoce múltiples bandas microbianas que se observaron a niveles moleculares de ~30, 35, 40, 45 y 65 kDa. Este resultado sugiere que los microorganismos tienen la capacidad de citrulinar antígenos ya que algunos péptidos microbianos están citrulinados endógenamente (Figuras 7.7, 7.8).

Proteobacteria



Firmicutes



Ascomycota

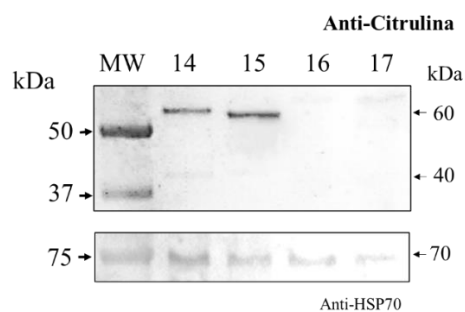


Figura 7.7: Western blot. Citrulinación de Ags en miembros de la microbiota. Se muestra la expresión de proteínas endógenamente citrulinadas en miembros de las filas Proteobacteria: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgannii*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, Firmicutes: 10. *L. casei*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, y Ascomycota: 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis* y 17. *S. cerevisiae*. En la parte inferior de cada blot, se muestra la expresión de la proteína constitutiva.

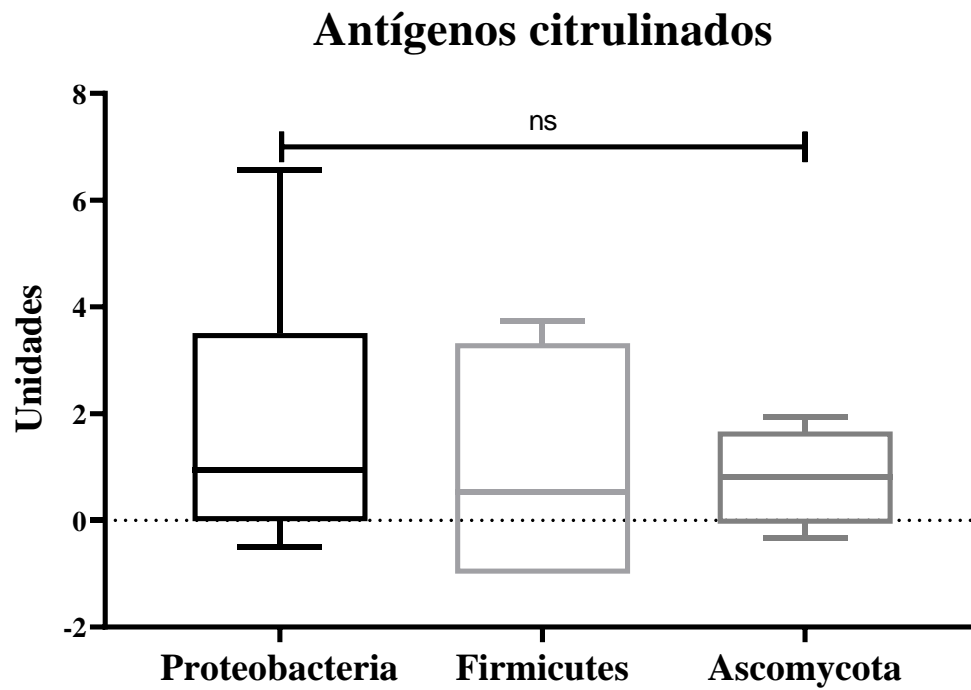


Figura 7.8: Comparación de la expresión de AgCIT en filas microbianas. Se muestra la expresión de antígenos citrulinados como medianas y rangos en las filas Proteobacteria, Firmicutes y Ascomycota, sin mostrar diferencias significativas entre los 3 grupos, según la prueba de Kruskal-Wallis, ns = no significativo.

7.7. La expresión de AgCIT se asocia con la expresión de Hs-PAD2 y PAD4 en Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota.

Los AgCIT se correlacionaron con PAD2 y PAD4, encontrando una correlación positiva media en Proteobacteria ($r_s = 0.393/0.418$), una correlación positiva perfecta en Firmicutes ($r_s = 1.00/1.00$) y una correlación positiva considerable en Ascomycota ($r_s = 0.400/0.800$) (Figuras 7.9-7.11).

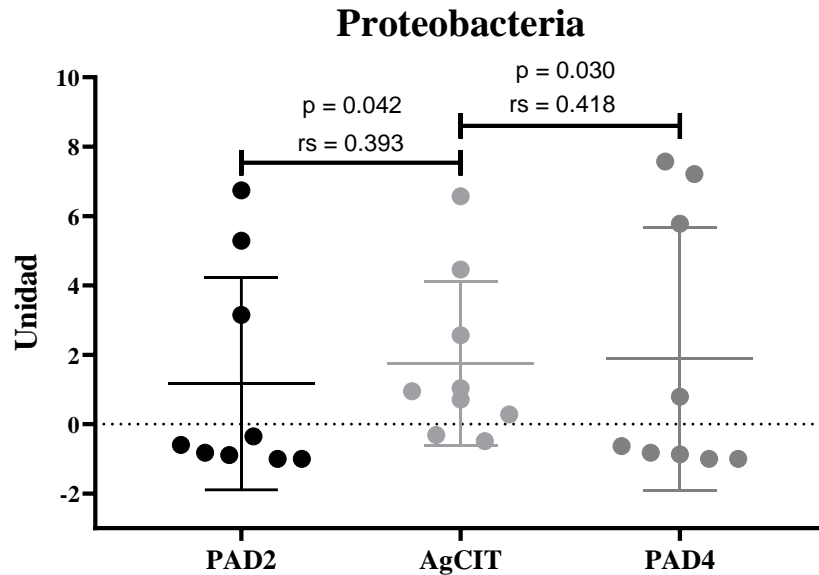


Figura 7.9: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Proteobacteria. Se muestra la expresión de antígenos citrulinados y enzimas homólogas de las especies pertenecientes al filo Proteobacteria, mostrando una correlación positiva media, mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis estadístico permitió presentar solo valores de expresión positivos después de la normalización con la proteína constitutiva HSP70. El valor de p corresponde a la significancia de la correlación.

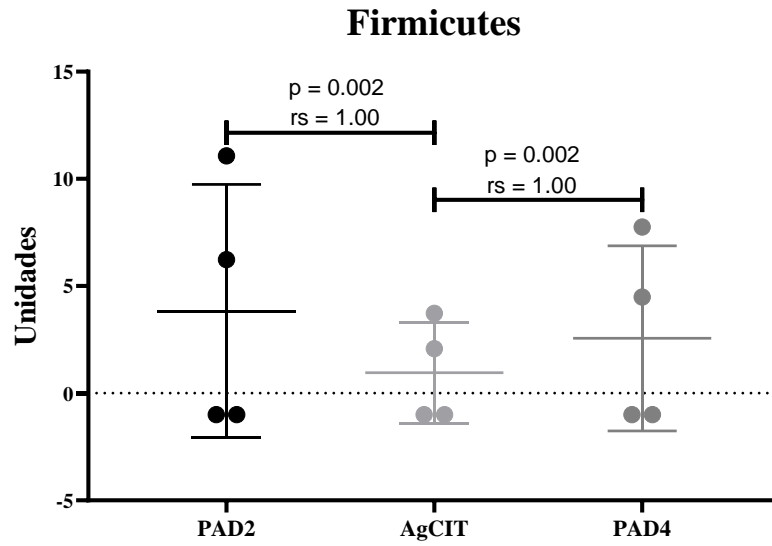


Figura 7.10: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Firmicutes. Se muestra la expresión de antígenos citrulinados y enzimas homólogas de las especies pertenecientes al filo Firmicutes, mostrando una correlación positiva perfecta, mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis estadístico permitió presentar solo valores de expresión positivos después de la normalización con la proteína constitutiva HSP70. El valor de p corresponde a la significancia de la correlación.

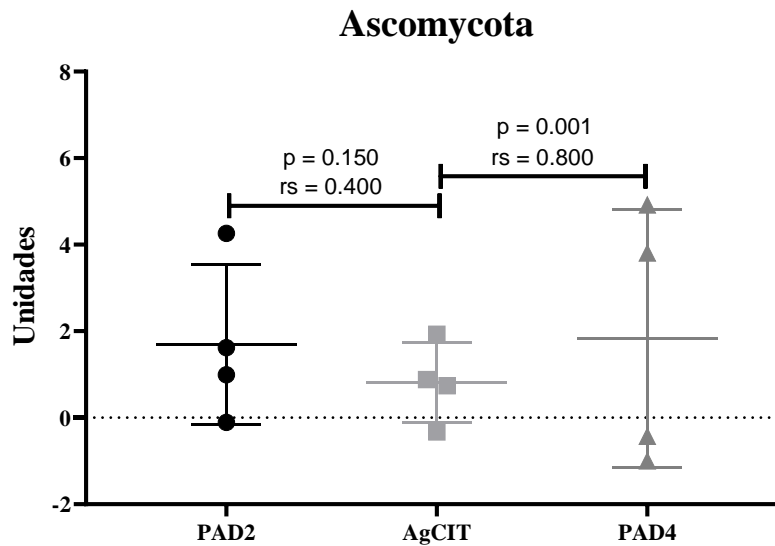


Figura 7.11: Correlación de la expresión de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en Ascomycota. Se muestra la expresión de antígenos citrulinados y enzimas homólogas de las especies pertenecientes al filo Ascomycota, mostrando una correlación positiva considerable, mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis estadístico permitió presentar solo valores de expresión positivos después de la normalización con la proteína constitutiva HSP70. El valor de p corresponde a la significancia de la correlación.

7.8. Especies patógenas sugieren citrulinación de Ags por Hs-PAD2/PAD4.

El 89% de especies de Proteobacteria expresó antígenos citrulinados (AgCIT) y se correlacionó con la expresión de Homólogos de PAD2/PAD4 (Hs-PAD2/PAD4) presentes en el 56% del filo, curiosamente, el 33% no presentó correlación ya que expresó AgCIT, pero no las enzimas homólogas. Además, el 50% de Firmicutes expresó AgCIT que se correlacionó con la expresión de Hs-PAD2/PAD4. Por último, el 75% del filo Ascomycota expresó AgCIT que también se correlacionó con la expresión de Hs-PAD2/PAD4. De manera que, estas especies presentan la capacidad de citrulinar endógenamente sus proteínas y es muy probable que sus enzimas Hs-PAD2/PAD4 estén catalizando la reacción. Interesantemente, todas ellas son especies patógenas (Figura 7.12).

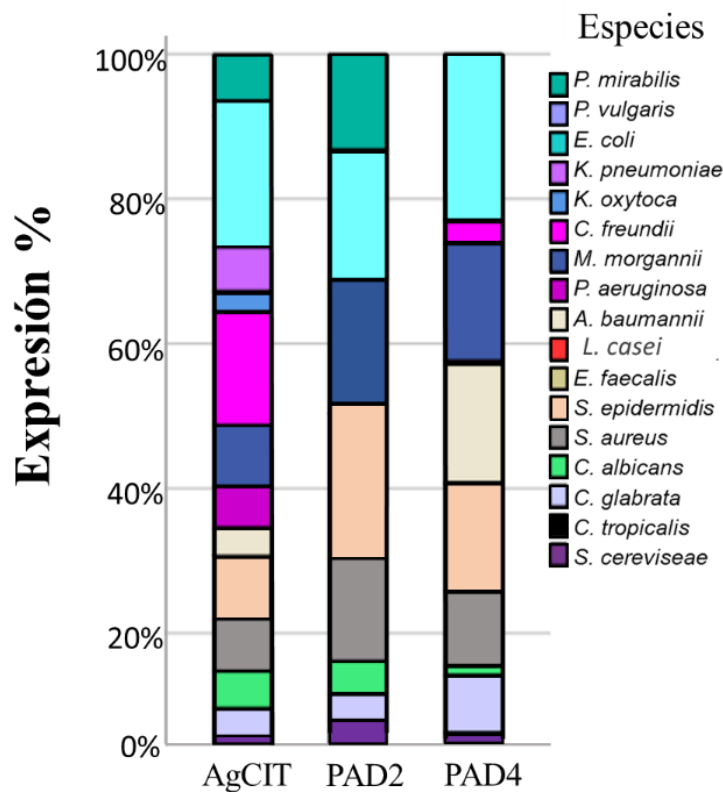


Figura 7.12: Porcentaje de expresión de AgCIT, Hs-PAD2 y Hs-PAD4 por especie. Se muestra un gráfico de barras apiladas que representa el porcentaje de expresión en los 17 miembros de la MH, pertenecientes a las filas Proteobacteria, Firmicutes y Ascomycota.

Tabla 7.5. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en especies de Proteobacteria.

	AgCIT vs Hs-PAD2		AgCIT vs Hs-PAD4	
	<i>rs</i>	<i>p</i>	<i>rs</i>	<i>p</i>
<i>P. mirabilis</i>	1.00	0.022		
<i>P. vulgaris</i> *	*	*	*	*
<i>E. coli</i>	1.00	0.002	1.00	0.002
<i>K. pneumoniae</i>	-1.00	0.002		
<i>K. oxytoca</i>	-0.86	0.001	-1.00	0.002
<i>C. freundii</i>			0.50	0.091
<i>M. morgannii</i>	1.00	0.002	1.00	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	-1.00	0.002	-1.00	0.002
<i>A. baumannii</i>			1.00	0.002

No expresó AgCIT ni enzimas Hs-PAD2/PAD4*

Tabla 7.6. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en especies de Firmicutes.

	Antígenos citrulinados vs PAD2		Antígenos citrulinados vs PAD4	
	<i>rs</i>	<i>p</i>	<i>rs</i>	<i>p</i>
<i>L. casei</i> *	*	*	*	*
<i>E. faecalis</i> *	*	*	*	*
<i>S. epidermidis</i>	1.00	0.002	0.86	0.001
<i>S. aureus</i>	1.00	0.002	1.00	0.002

No expresó AgCIT ni enzimas Hs-PAD2/PAD4*

Tabla 7.7. Asociaciones de AgCIT vs Hs-PAD2/PAD4 en especies de Ascomycota.

	Antígenos citrulinados vs PAD2		Antígenos citrulinados vs PAD4	
	<i>rs</i>	<i>p</i>	<i>rs</i>	<i>p</i>
<i>C. albicans</i>	1.00	0.002	0.866	0.001
<i>C. glabrata</i>	1.00	0.035	1.00	0.035
<i>C. tropicalis</i>	*	*	*	*
<i>S. cerevisiae</i>	1.00	0.002	1.00	0.002

No expresó AgCIT ni enzimas Hs-PAD2/PAD4*

7.9. Especies patógenas de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota, presentan actividad de citrulinación por la vía NOS/NO.

La actividad de citrulinación se presentó en el 50% de Firmicutes, en el 50% de Ascomycota y en el 57% de Proteobacteria (Figura 7.13). De las 8 especies que presentaron actividad de citrulinación solo el 88% se correlacionó con la expresión de AgCIT (Tabla 7.8). Es probable que el resto de especies carezca de la NOS y citrulinen por una vía diferente.

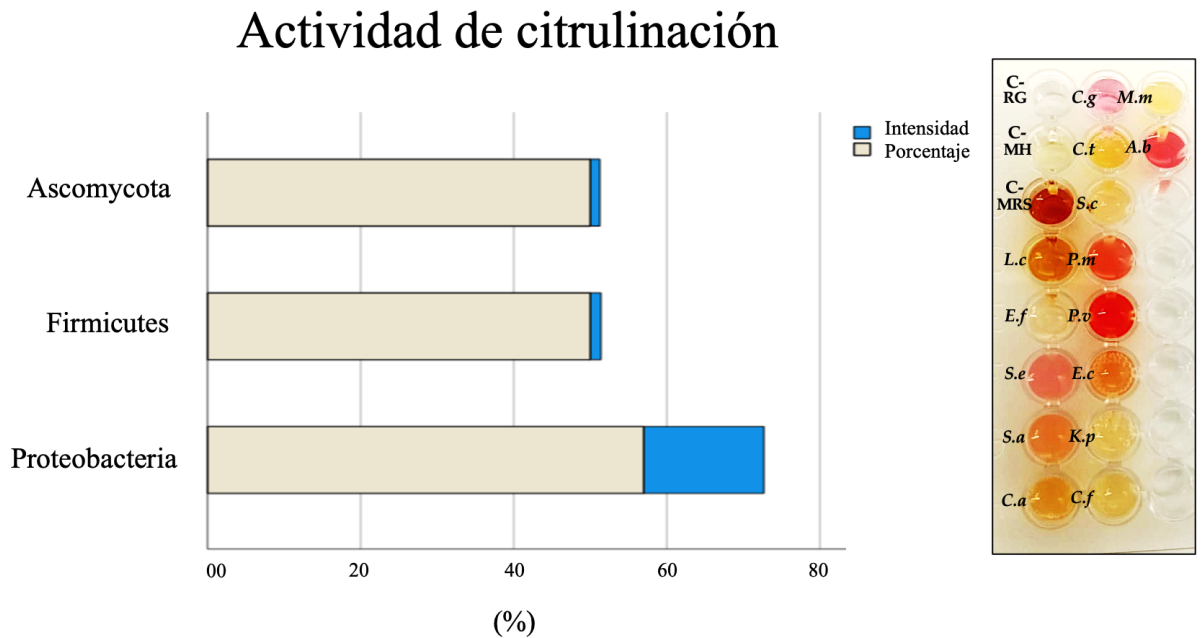


Figura 7.13: Determinación de la actividad de citrulinación en cultivos microbianos. Se muestra el porcentaje de especies de cada fila microbiana que presentó actividad de citrulinación por la vía NOS/NO. RG = Reactivo de Griess, MH = agar Mueller-Hinton, MRS = agar Man Rogosa Sharp. *L.c* = *L. casei*, *E.f* = *E. faecalis*, *S.e* = *S. epidermidis*, *S.a* = *S. aureus*, *C.a* = *C. albicans*, *C.g* = *C. glabrata*, *C.t* = *C. tropicalis*, *S.c* = *S. cerevisiae*, *P.m* = *P. mirabilis*, *P.v* = *P. vulgaris*, *E.c* = *E. coli*, *K.p* = *K. pneumoniae*, *C.f* = *C. freundii*, *M.m* = *M. morgannii* y *A.b* = *A. baumannii*. *K. oxytoca* y *P. aeruginosa* no fueron determinadas

Tabla 7.8. Asociaciones de AgCIT vs Actividad de citrulinación en especies.

Actividad de citrulinación vs Antígenos citrulinados		
	<i>rs</i>	p
<i>P. mirabilis</i>	1.00	0.001
<i>P. vulgaris</i> *	*	*
<i>E. coli</i>	1.00	0.001
<i>A. baumannii</i>	1.00	0.001
<i>S. epidermidis</i>	1.00	0.001
<i>S. aureus</i>	1.00	0.001
<i>C. albicans</i>	1.00	0.001
<i>C. glabrata</i>	1.00	0.001

Presentó actividad de citrulinación, pero no antígenos citrulinados*

7.10. Los casos (AR) presentaron biomarcadores serológicos positivos.

Los sueros AR tuvieron un título promedio de anticuerpos anti-CCP de 345.20 ± 332 U/mL, de los cuales, el 90% correspondieron a pacientes del género femenino (F) y el 10% al masculino (M), con un promedio de edad de 50 ± 14 años, VSG de 24 ± 17 mm/h y FR de 34 ± 35 (Tabla 7.9). Los sueros control, arrojaron valores negativos de los cuales el 40% correspondían a sujetos del género F y el 60% al género masculino (M) con una edad promedio de 25 ± 5 años.

Los parámetros clínicos medidos muestran claramente la marcada diferencia entre grupos. Esto permitió a su vez, clasificar a los pacientes AR como seropositivos debido a que el parámetro clínico de mayor puntaje según los criterios de clasificación del ACR/EULAR es la presencia de anticuerpos anti-CCP positivos a títulos elevados.

Tabla 7.9. Datos clínicos de pacientes con AR.

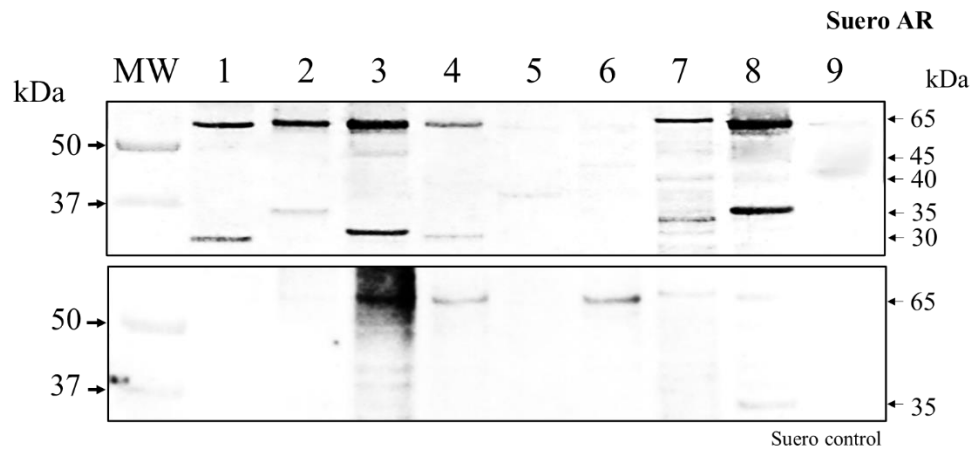
n	Edad	Género	VSG mm/h	FR U/mL	CCP U/mL
1	62	F	39	40	282
2	36	F	20	40	226
3	58	F	43	0	383
4	28	F	4	20	244
5	33	F	6	0	128
6	49	F	26	0	119
7	51	F	20	80	1260
8	48	M	12	80	323
9	71	F	8	0	283
10	36	F	-	80	204
\bar{x}	50		23.60	34.00	345.20
DS	14.22	9F/1M	17.29	35.34	331.56

CCP = Determinación de AuAbs anti- Péptidos citrulinados (valor de referencia ≥ 5 U/mL), FR = Factor Reumatoide (valor de referencia ≥ 20 U/mL), VSG = Velocidad de Sedimentación Globular (valor de referencia, de 15-20 mm/h).

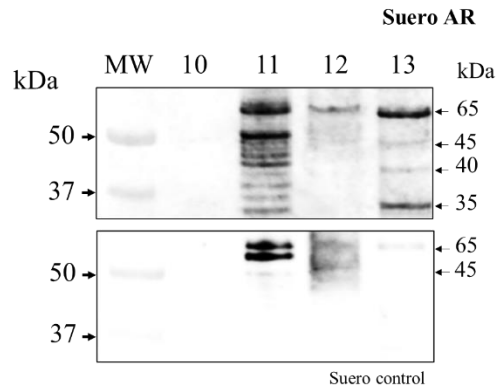
7.11. La reactividad antimicrobiana se incrementa en los casos (AR) y el isotipo IgG es mayormente reactivo.

Se investigó la presencia de anticuerpos de clase IgG en los sueros como una huella digital de eventos disbióticos y se encontró que los pacientes con AR muestran Abs de clase IgG dirigidos contra diversas proteínas microbianas, en contraste con las muestras de sueros control que mostraron niveles más bajos. Sin embargo, la reactividad es inespecífica y puede corresponder solo a Abs antimicrobianos, ya que no hay certeza del reconocimiento hacia AgCIT microbianos. Además, la reactividad de Abs IgA no mostró diferencias entre grupos (Figuras 7.14 y 7.15). No obstante, se encontró una correlación positiva débil ($r_s = 0.146$) entre Abs IgG antimicrobianos y ACPAs IgG (Tabla 7.10).

Proteobacteria



Firmicutes



Ascomycota

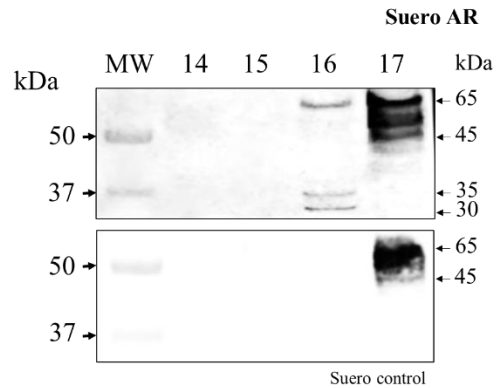


Figura 7.14: Diferencias en la reactividad anti-microbiana en sueros AR y controles. Un panel representativo de WB muestra el reconocimiento inmunológico de IgG en sueros AR y una menor reactividad en los sueros control. La reactividad a bandas inespecíficas puede corresponder solo a Abs antimicrobianos. Las líneas corresponden a: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgannii*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, 10. *Lactobacillus sp.*, 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis*, and 17. *S. cerevisiae*.

Isotipo reactivo a proteínas microbianas

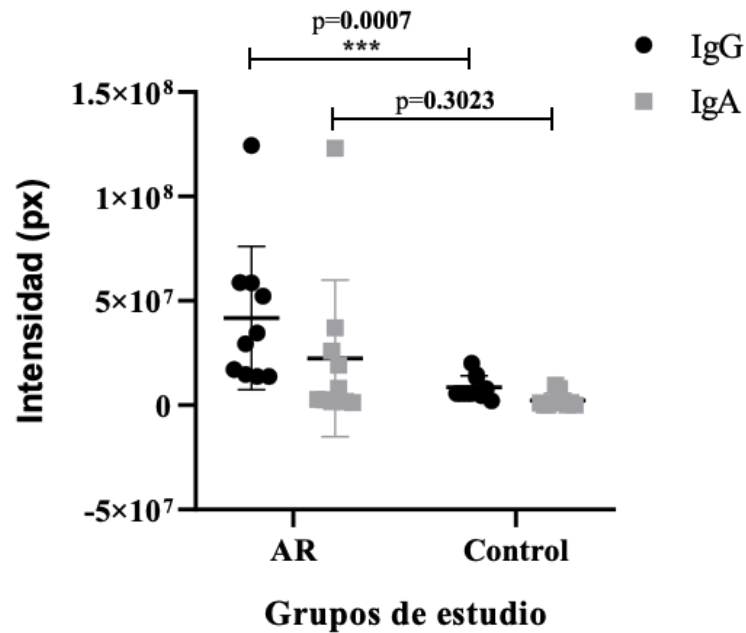


Figura 7.15: Isotipo de Igs reactivas a Ags microbianos en casos (AR) y controles. Se muestra que el isotipo IgG participa principalmente en la reactividad de las proteínas microbianas, y la diferencia entre grupos es altamente significativa ($p=0.0007$), mientras que la reactividad del isotipo IgA no muestra diferencias entre grupos ($p=0.3023$) según la prueba de Kruskal wallis. Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo.

Tabla 7.10. Asociación de Abs antimicrobianos en pacientes con AR.

	<i>rs</i>	p
Abs IgG anti-microbianos vs Abs IgG Anti-CCP	0.146	0.312

7.12. Los ACPAs de afinidad reconocen AgCIT.

Se pudo demostrar que los ACPAs de afinidad de pacientes AR específicos para péptidos citrulinados, reconocen algunas bandas microbianas de ~30, 45 y 65 kDa, que coinciden con bandas reactivas al pAb anti-citrulina comercial, revelando una coincidencia del 40% en Proteobacteria, 33% en Firmicutes y 40% en Ascomycota (Figura 7.16).

Este resultado refuerza que algunos péptidos microbianos están citrulinados endógenamente y muestra que los ACPAs de pacientes con AR, tienen afinidad por estos péptidos.

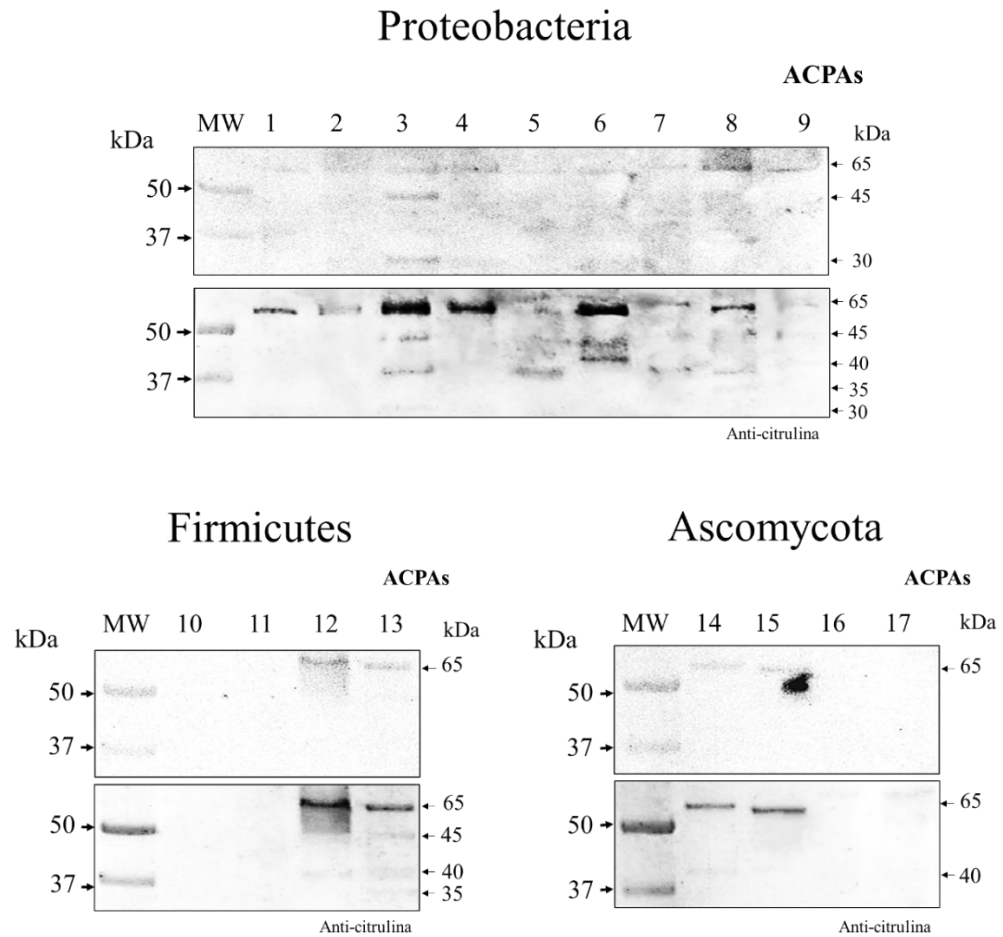


Figura 7.16: Reactividad coincidente entre ACPAs de afinidad vs pAb anti-citrulina. La expresión de antígenos citrulinados se muestra mediante la reactividad con pAb anti-citrulina comercial y los ACPAs de afinidad. Las líneas corresponden a proteínas de diferentes especies: 1. *P. mirabilis*, 2. *P. vulgaris*, 3. *E. coli*, 4. *K. pneumoniae*, 5. *K. oxytoca*, 6. *C. freundii*, 7. *M. morgannii*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *A. baumannii*, 10. *Lactobacillus* sp., 11. *E. faecalis*, 12. *S. epidermidis*, 13. *S. aureus*, 14. *C. albicans*, 15. *C. glabrata*, 16. *C. tropicalis*, and 17. *S. cerevisiae*.

7.13. Los casos (AR) presentan niveles elevados de AbsZON

Se demostró la presencia de niveles elevados de AbsZON en los casos (AR) en comparación con el grupo control (Figura 7.17), lo que podrían indicar un aumento en la PI.

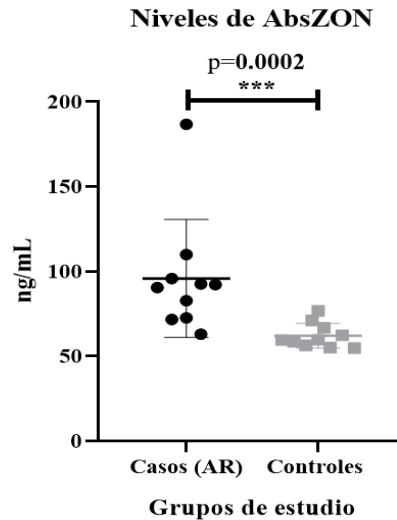


Figura 7.17. Diferencias en los niveles de AbsZON en casos (AR) y controles. Se muestran los niveles séricos de AbsZON elevados en los casos (AR) en comparación con los controles, y la diferencia entre grupos es altamente significativa ($p = 0.0002$), según la prueba U de Mann-Whitney. Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo.

7.14. Los AbsZON se asocian positivamente con AR.

Los AbsZON se presentaron en 9 individuos en el grupo de los casos (AR) y en 1 individuo en el grupo de los controles. El resultado es una prevalencia del 90% y 10%, respectivamente. Al evaluar la relación entre los AbsZON y AR se encuentra una asociación positiva: el riesgo de tener AbsZON es 81 veces mayor en los individuos con AR, comparado con individuos sanos, la cual es significativa, ya que los IC 95% no abarcan el valor nulo, teniendo una variabilidad de esta asociación 5.02 veces mayor, o tan grande como 941.2 veces mayor (Tabla 7.12-7.14). En este caso, el riesgo atribuible en la población es 0.88; en otras palabras, los AbsZON en la población general, son responsables del 88% de los casos de AR.

Tabla. 7.11. Tabla de contingencia para la exposición a AbsZON.

Exposición a AbsZON			
	Expuestos	No expuestos	TOTAL
Casos (AR)	a (9)	b (1)	n1 (10)
Controles	c (1)	d (9)	n0 (10)
Total	m1	m0	N (20)

a=individuos que desarrollaron el evento y estaban expuestos, b= individuos que desarrollaron el evento y que no estaban expuestos, c= individuos que no desarrollaron el evento y estaban expuestos, d= individuos que no desarrollaron el evento y no estaban expuestos, m1=total de individuos expuestos, m0=total de individuos no expuestos, n1=total de casos, n0=total de controles, N=total de la población en estudio.

Tabla 7.12. Frecuencias de AbsZON en casos y controles, y Razón de Momios (RM).

	Prevalencia de exposición		Momios de exposición		RM	95% IC
Casos (AR)	a/n1	90%	a/b	9	ad/bc	5.02-941.2
Controles	c/n0	10%	c/d	0.11	81	

Tabla 7.13. Interpretación de los resultados.

Interpretación		
RM = 1	No hay asociación	Los AbsZON no están asociados con AR
RM < 1	Asociación negativa	Los AbsZON están asociados de manera inversa con AR, es decir, los AbsZON disminuyen la posibilidad de desarrollar AR.
RM > 1	Asociación positiva	Los AbsZON se encuentran asociados positivamente con AR.

7.15. Los AbsZON se asocian con biomarcadores serológicos de pacientes AR.

Se encontró una correlación positiva con la edad de los pacientes ($rs=0.479$), con la VSG ($rs=0.285$) y con el FR ($rs=0.165$) (Tabla 7.11), lo que puede corresponder que, a mayor edad, inflamación y niveles elevados de anticuerpos del FR, se presenta mayor PI.

Tabla 7.14. Asociaciones de AbsZON y biomarcadores serológicos de AR.

	<i>rs</i>	p
AbsZON vs Edad	0.479	0.004
AbsZON vs VSG	0.285	0.045
AbsZON vs FR	0.165	0.251

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN

El microbioma humano es un elemento importante que sirve como interfaz en huéspedes humanos con EAI [16] incluyendo la AR, su aparición se ha asociado con DI y PI [17, 18], sin embargo, los mecanismos moleculares, no han sido dilucidados. La evidencia experimental sobre Hs-PADs, citrulinomas microbianos y generación de ACPAs por la MH, son limitados, así como los estudios de PI, en pacientes con AR. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la expresión de Hs-PAD2/ PAD4 y citrulinomas en miembros de la MH pertenecientes a las filas Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota, Asimismo, se determinó, si los sueros ACPAs de pacientes AR, reconocen proteínas microbianas citrulinadas. Además, se evaluó si los casos (AR) presentan niveles elevados de AbsZON asociados con la enfermedad.

Los resultados son: 1. Las filas Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PAD2/PAD4, 2. Los Citrulinomas microbianos están presentes en Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota, 3. La expresión de AgCIT se asocia con la expresión de Hs-PAD2/PAD4, 4. Las especies patógenas de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota sugieren citrulinación de Ags por Hs-PAD2/PAD4, 5. Las especies patógenas de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota, presentan actividad de citrulinación por la vía NOS/NO, 6. La reactividad antimicrobiana se incrementa en los casos (AR) y el isotipo IgG es mayormente reactivo, 7. Los ACPAs de afinidad reconocen AgCIT, 8. Los casos (AR) presentan niveles elevados de AbsZON, 9. Los AbsZON se asocian positivamente con AR, 10. Los AbsZON se asocian con biomarcadores serológicos de AR.

Cummings et al., (2021) reportan Hs-PADs/ADs en las filas Cyanobacteria, Actinobacteria y Proteobacteria e infieren que han sido introducidos en mamíferos por transferencia de genes horizontal [29]. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en el presente estudio ya que se detectó que las filas Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PAD2 y PAD4.

Cabe mencionar que la aportación de estos autores solo se basa en análisis de datos en los bancos de información disponibles, por lo que los hallazgos presentados en este estudio ganan peso ya que aportan evidencia experimental, y sugieren que el filo Firmicutes y Ascomycota deben considerarse como nuevas filas que albergan Hs-PADs/ADs.

Las PADs son enzimas conservadas filogenéticamente que catalizan la deiminación/citrulinación postraduccional de proteínas, provocando cambios estructurales y funcionales [21] y el homólogo microbiano asociado ha sido pPAD, dicha enzima bacteriana, tiene un peso molecular de 47 kDa [215]. Aunado a esto, un análisis evolutivo reciente, muestra conservación filogenética entre PAD2 y PAD3 humano con enzimas ADs de *E. coli* VCS257 (GenBank: EDV68547.1) y *S. aureus* (GenBank: BBA25170.1) en cuyo genoma se identificó una masa molecular entre 40-50 kDa, además, se ha postulado que la conformación terciaria de ADs de *E. coli* y *S. aureus* puede ser más similar a la PAD4 humana, sin embargo, falta evidencia que lo respalde [29].

Estos reportes, coinciden parcialmente con los encontrados en la presente investigación, ya que 9 especies expresaron Hs-PAD4 y 8 especies, Hs-PAD2 con masas moleculares similares a las antes mencionadas, no obstante, los Hs-PAD2 de las especies analizadas en este estudio, presentaron masas moleculares similares a la de PAD2 humana. Esto podría sugerir que las enzimas microbianas identificadas, presenten algunos dominios que compartan homología con enzimas humanas debido a que son igualmente funcionales e inmunogénicas, sin embargo, falta evidencia estructural que respalde.

Ahora bien, las bacterias Gram negativas y Gram positivas pueden utilizar sus PADs/ADs para la liberación de vesículas de membrana externa (OMV, outer membrane vesicles por sus siglas en inglés) y vesículas de membrana (MV, membrane vesicles por sus siglas en inglés) que facilitan la transferencia de moléculas [216,217]. Kosgodage et al., (2019) comprobaron que las OMV de *E. coli* contienen Hs-PADs/ADs además de proteínas citrulinadas [27]. Por su parte, los únicos citrulinomas bacterianos identificados hasta el momento son en *P. gingivalis* y en *E. coli* VCS257 [27, 214].

Por el contrario, los presentes resultados muestran citrulinomas en 10 bacterias (*P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *M. morgannii*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. epidermidis*, *S. aureus*) y 3 levaduras (*C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae*).

Interesantemente, el citrulinoma bacteriano identificado en *P. gingivalis* parece estar limitado a 6 proteínas [214], mientras que en *E.coli* VCS257 se reportan 11 proteínas metabólicas relacionadas con la respuesta al estrés, expresadas como bandas en el rango de 15 a 120 kDa [27]. Estos datos coinciden parcialmente con los mostrados en los 13 patógenos estudiados que revelaron 5 bandas de rangos moleculares similares; estas pudieran corresponder a las reportadas por Kosgodage et al., (2019), destacando la proteína ribosomal 30S/S4rpsD de 23 kDa (ID Uniprot: Q1R636). [218]. Previamente, la proteína ribosómica 40S se había informado como sustrato de la deiminación/citrulinación mediada por PAD4 en células HEK 293T [219].

Además del Componente EIIAB específico de manosa del sistema PTS/manX (sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato) de 35kDa (ID Uniprot: P69799) [220]; La Glicerol deshidrogenasa/gldA de 39 kDa (ID Uniprot: P0A9S6) y la Serina - tRNA ligasa/SERS de 48 kDa (ID Uniprot: B7MRV6) [221]. Otros antígenos citrulinados reportados en *E. coli* es la flagelina/fliC de 51 kDa (ID Uniprot: P04949), la Fumarato hidratasa clase I, anaeróbico/fumB de 60 kDa (ID Uniprot: P14407) [222] y la treonina-tRNA ligasa de 74 kDa, [223]. Así pues, tanto Hs-PADs/ADs como citrulinomas microbianos, han sido descritos en *P. gingivalis* y *E. coli*, lo que coincide con los resultados expuestos que demostraron correlación entre la expresión de AgCIT y Hs-PAD2/PAD4 en 10 patógenos.

Es probable que el resto de especies de Proteobacteria, pueda albergar otras moléculas, como es el caso de Eggerthella, que utiliza ornitina para producir citrulina [212]. Los Firmicutes *S. epidermidis* y *S. aureus* presentaron capacidad de citrulinar antígenos, que se correlacionaron con sus Hs-PAD2/PAD4, pero no fue el caso del resto de especies analizadas de este filo.

La especie *L. casei*, recientemente reclasificada, ha sido considerada como especie beneficiosa que puede ejercer efectos sobre la salud del huésped [224]. Por su parte, *E. faecalis* ha sido considerado como especie inmunomoduladora, sin embargo, no se excluye de poseer otros posibles factores de virulencia ya que, aunque genera un impacto positivo en el funcionamiento de la MI y sea usado como probiótico eficaz, también puede ser el responsable de infecciones [225].

Las levaduras de Ascomycota, *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae* citrulinan antígenos, que, de manera análoga, también se correlacionaron con la expresión de sus enzimas Hs-PAD2/PAD4. Esto llama la atención, ya que existen pocos estudios sobre la interacción de los hongos con el huésped humano, por lo que el componente fúngico de la microbiota, aunque es escaso, podría representar un blanco de estudio en AR ya que actualmente se ha revelado su capacidad para modular la respuesta inmune. Por su parte, el género *Saccharomyces*, aunque se ha asociado con fermentaciones de alimentos y bebidas, ha ganado un papel en las investigaciones sobre la interacción humana en la salud y la enfermedad [9]. Además, los escasos reportes sobre citrulinomas microbianos son solo en bacterias.

Otro dato importante, fue el estudio de actividad de citrulinación por la vía NOS/NO que mostró a las bacterias *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *A. baumannii* y las levaduras *C. albicans* y *C. glabrata* con actividad de citrulinación por esta vía. Es probable, que el resto de especies carezca de NOS y citrulinen por vías diferentes. Considerando los reportes de Huang et al., (2023) sobre el papel que desempeña la vía NOS/NO en la AR, estos hallazgos resultan ser interesantes, ya que la participación de las NOS microbianas podrían estar implicadas en la patogénesis simultáneamente con PADs/ADs y la citrulinación de proteínas. También fue interesante la revelación de *P. vulgaris* que mostró actividad de citrulinación pero no expresó AgCIT, probablemente la contribución de este patógeno a la AR, se limite a la producción de L-citrulina y NO.

Se ha determinado que la citrulinación de proteínas microbianas también puede ocurrir después de la lisis celular [213] y la hipercitrulinación de histonas humanas catalizada por PAD4 se correlaciona con la descondensación de cromatina durante la formación de NET. Además, la citrulinación de proteínas humanas disminuye la actividad de destrucción bacteriana de histonas y nucleosomas, lo que sugiere que PAD4 desempeña principalmente un papel en la descondensación de la cromatina para formar NET, en lugar de aumentar la muerte bacteriana mediada por histonas. Por lo que se ha definido un papel para la hipercitrulinación de histonas en la inmunidad innata durante la infección bacteriana [226].

Esto podría explicar los resultados del presente estudio que mostraron un incremento en la reactividad antimicrobiana en sueros AR, por lo que es muy probable que durante la NETosis y METosis, aumente la expresión de PADs/ADs microbianas y estrés oxidativo, y se induzca citrulinación de antígenos microbianos que puedan contribuir a la producción excesiva de ACPAs microbianos, y actúen en sinergia para romper la tolerancia inmunológica en pacientes predispuestos a la AR. Ésta idea se refuerza con el reconocimiento de AgCIT por los ACPAs de afinidad de pacientes con AR que concuerda con lo reportado por Arnoux et al., quienes demostraron la generación de ACPAs inducida por pPAD en *P. gingivalis* [34].

Por lo tanto, los hallazgos presuntivos sugieren que más microorganismos patógenos pudieran desempeñar un papel en la patogénesis de la AR. Esto refuerza la necesidad de seguir investigando el fenómeno observado y, el hecho de que exista presencia de anticuerpos antimicrobianos de clase IgG en los casos (AR), pero no en los controles, condujo al planteamiento de que probablemente, estos anticuerpos son rastros de un evento disbiótico. Por su parte, los ACPAs se consideran actores críticos en la patogenia de la AR y la primera evidencia de que *P. gingivalis* tiene potencial artritogénico al impulsar ACPAs fue en 2019, sin embargo, se menciona que la respuesta no es específica de proteínas citrulinadas humanas [227].

Además, Cantaert et al., (2013) mencionan que tienen reactividad de falsos positivos [228] y que con frecuencia se malinterpreta como positividad para ACPAs humanos cuando no se incluyen controles de péptidos no citrulinados para confirmar la especificidad [25]. Hasta el momento, no existe evidencia experimental que respalde que la AR está mediada por la inducción de ACPAs a través de pPAD contra proteínas del huésped [229], sin embargo, se ha reportado exacerbación o inducción de la enfermedad por mecanismos independientes, que impliquen la actividad de pPAD como factor de virulencia dirigido a sustratos proteicos o L-citrulina libres [25].

Aunado a ello, las PADs humanas procesan las argininas dentro de las cadenas polipeptídicas pero no en sus extremos, es decir, son endodeimasas eficientes pero exodeimasas pobres [230]. Por el contrario, pPAD citrulina las argininas C-terminales [230]. De esta forma, pPAD complementa a las PADs humanas y crea nuevos epítomos exógenos para la respuesta autoinmune [25]. Lo anterior pudiera explicar la baja reactividad de los ACPAs en el presente estudio, sin embargo, se sugiere continuar con su exploración.

Está claro que aún queda mucho por responder; sin embargo, esta investigación, a través de un estudio exploratorio de proteínas microbianas, sugiere que los Hs-PADs/ADs y los citrulinomas microbianos están ampliamente distribuidos en el microbioma humano y no se limitan a *P. gingivalis* y *E. coli*. Y, aunque es probable que muchas especies tengan la capacidad de generar péptidos citrulinados, muchos de estos péptidos modificados pudieran ser irrelevantes para inducir la AR. Otra posibilidad es que no compartan mimotopos o que los individuos que portan estos péptidos microbianos citrulinados carezcan de un "epítomo compartido".

Por otro lado, no es sorprendente que todas las especies evidenciadas en la actual investigación, sean patógenas, lo que podría indicar un papel molecular en la DI presente en AR y posiblemente en otras patologías que involucren hipercitrulinación.

Numerosas investigaciones se han centrado en la hipótesis de que los microbios intestinales y la translocación de enzimas microbianas pueden influir en una mayor citrulinación de péptidos que conduce a la producción de ACPAs e inflamación a través de mecanismos de filtración y migración a las articulaciones, provocando respuestas inmunes y sinovitis [18]. Por su parte, los estudios moleculares han demostrado que las bacterias pueden migrar a la periferia y contribuir a la inflamación sinovial [231,232], asimismo, se han descrito más de 200 péptidos citrulinados en estudios proteómicos en la mucosa colónica de sujetos con AR, que incluyen dianas de ACPAs, pero solo tres exclusivos de esta patología [233], sin embargo, no se descarta que algunos de estos péptidos puedan tener un origen microbiano.

Recientemente, se han postulado los mecanismos moleculares de ataque a las TJ de CEI, y se comprobó que son orquestados por bacterias patógenas durante la DI [118]. Por su parte, debido a su papel como potente regulador de las TJ, la Zonulina se usa para predecir la transición de la autoinmunidad a la artritis inflamatoria y los niveles elevados van acompañados de una disbiosis microbiana, aumento en la Permeabilidad, e inflamación [234]. Sin embargo, debido a su fluctuación, se recomienda la medición de AbsZON y otras proteínas de unión estrecha para evaluar la PI [99].

Tajik et al., (2020) reportan niveles elevados de Zonulina en sueros de pacientes con AR, lo que coincide parcialmente con los resultados expuestos que mostraron niveles elevados de AbsZON en los casos (AR). Un dato interesante del estudio de los autores fue la evidencia de que los niveles se elevan antes de la aparición de las manifestaciones clínicas [234]. No obstante, el presente estudio es el primero en demostrar que los pacientes con AR cursan con niveles elevados de AbsZON, sin embargo, la determinación no ha sido evaluada como prueba diagnóstica. Aunado a esto, este importante hallazgo sugiere un aumento en la PI que podría representar un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad en personas predispuestas.

Además, también es la primera investigación en evaluar la expresión de Hs- PADs/ADs y citrulinación endógena en miembros de la MH, incluyendo no solo bacterias oportunistas, sino también probióticas y levaduras. Estos resultados son de gran importancia, porque podrían proporcionar el vínculo molecular entre los PADs/ADs microbianos y los ACPAs microbianos, que actúen en sinergia para aumentar la inflamación y el desarrollo de la AR. Sería interesante purificar y secuenciar las dianas microbianas reveladas en este estudio y ampliar el conocimiento sobre el papel patogénico que desempeña el microbioma humano en la AR.

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES

Patógenos de Firmicutes, Proteobacteria y Ascomycota albergan Hs-PADs/ADs y AgCIT que reaccionan a los ACPAs de pacientes con AR. Esto sugiere que los citrulinomas microbianos y las enzimas homólogas de PADs/ADs son extensos en el microbioma humano y participan en la producción de ACPAs. Los niveles elevados de AbsZON sugieren un aumento en la PI y la asociación positiva con la AR, permitió identificarlos como un posible factor de riesgo que generó hipótesis para estudios subsecuentes que permitan tanto la evaluación como prueba diagnóstica, como la evaluación del impacto que tienen los AbsZON sobre la AR. Los presentes hallazgos sugieren que las moléculas de los microorganismos de una microbiota disbiótica reveladas en esta investigación, y el aumento de la PI, podrían representar un vínculo molecular en la patogénesis de la AR.

CAPÍTULO 10. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DE LA TESIS

Fortalezas:

1. Primera investigación en estudiar la expresión de Hs-PADs/ADs y citrulinación endógena en 3 filas pertenecientes a la MH y en 17 miembros a nivel especie.
2. Primera investigación que estudia la expresión de Hs-PADs/ADs y citrulinación endógena en bacterias probióticas y levaduras.
3. Primer estudio en demostrar que los pacientes con AR cursan con niveles elevados de AbsZON y que sugiere su medición como posible biomarcador de PI.

Limitaciones:

1. No fue posible identificar las cepas mediante estudios moleculares.
2. El número de muestras serológicas y el acceso a la información sobre manifestaciones clínicas de los casos (AR).

CAPÍTULO 11. PERSPECTIVAS

- Explorar los genomas bacterianos y micóticos de las especies estudiadas, y secuenciar los Hs-PADs/ADs y AgCIT.
- Explorar Hs-PADs/ADs y AgCIT en la fila Cianobacteria.
- Diseñar un estudio de cohorte prospectivo para ver la progresión de citrulinación de proteínas y aparición de biomarcadores de PI y AR en diferentes tiempos.
- Diseñar un estudio de prueba diagnóstica para la determinación de AbsZON como biomarcador de PI en AR.
- Diseñar mecanismos de inhibición molecular de las especies bacterianas y micóticas que presentaron Hs-PADs/ ADs y citrulinomas.
- Diseñar propuestas de inhibición de PI.
- Explorar el papel de las NOS bacterianas y micóticas en la AR.

CAPÍTULO 12. PROPUESTA DEL MECANISMO MOLECULAR EN LA PATOGÉNESIS DE AR

Con los resultados expuestos en esta investigación, se podría postular que el aumento de PI, permite la translocación microbiana a sitios distantes como las articulaciones que, en personas genéticamente susceptibles, podría contribuir al desarrollo de AR. Los posibles mecanismos que presentan las moléculas microbianas reveladas en esta investigación, pudieran ser los siguientes:

1. Los Hs-PADs/ADs podrían promover la activación de células T en los tejidos linfoides que resulta en un desequilibrio de células Th17 y Treg que conduce a la respuesta inflamatoria.
2. Los Hs-PADs/ADs podrían promover la NETosis y METosis.
3. Las NOS microbianas podrían promover estrés oxidativo.
4. La actividad citrulinante de Hs-PADs/ADs sobre proteínas microbianas induce la generación de ACPAs.
5. Los antígenos microbianos también pueden inducir la sobre activación de los linfocitos B con ayuda de Thf, diferenciándose en células plasmáticas y produciendo Abs patógenos de faja afinidad como la IgM del FR y la IgA anti-CCP, que posteriormente presenten una transición a AuAbs de isotipo IgG.
6. El cúmulo de ACPAs microbianos, podría romper la tolerancia inmunológica.
7. La DI podría desencadenar la migración de células autorreactivas a las articulaciones provocando daño en cartílago y hueso.
8. Las células autorreactivas activan macrófagos, que da como resultado la producción de citocinas inflamatorias que inducen a los fibroblastos a producir MMP y el ligando activador del receptor del factor nuclear kB (RANKL) que media en la destrucción del tejido óseo y cartilaginoso, lo que conduce al desarrollo de AR.

CAPÍTULO 13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lederberg, J. y McCray, A.T. ‘Ome sweet’Omics—A genealogical treasury of words. *Scientist*, **15**, 7, (2001) link.gale.com/apps/doc/A73535513/AONE?u=anon~b7245b06&sid=googleScholar&xid=15f2b2b8
- [2] Dekaboruah, E., Vasant-Suryavanshi, M., Chettri, D. y Kumar-Verma, A. Human microbiome: An academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch. Microbiol.*, **202**, 2147–2167, (2020) DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
- [3] Sender, R., Fuchs, S. y Milo, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, **164**, 337–340, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- [4] Kalbermatter, C., Fernandez-Trigo, N., Christensen, S.C. Maternal microbiota, early life colonization and breast milk drive immune development in the newborn., *Front. Immunol.*, **12**, 683022, (2021) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683022>
- [5] Del Chierico, F., Vernocchi, P., Petrucca, A., Paci, P., Fuentes, S., Praticò, G., Capuani, G., Masotti, A., Reddel, S., Russo, A., Vallone, C., Salvatori, G., Buffone, E., Signore, F., Rigon, G., Dotta, A., Miccheli, A., de Vos, W. M., Dallapiccola, B., Putignani, L. Phylogenetic and metabolic tracking of gut microbiota during perinatal development., *PLoS ONE*, **10**, e0137347, (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137347>
- [6] Schanche, M., Avershina, E., Dotterud, C., Øien, T., Storrø, O., Johnsen, R., Rudi, K. High-resolution analyses of overlap in the microbiota between mothers and their children., *Curr. Microbiol.*, **71**, 283–290, (2015) <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0843-5>
- [7] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome., *Nature*, **486**, 207–214, (2012) <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- [8] Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Abele, G., Miggiaro, D., Gasbarrini, A., Mele, M.C. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases., *Microorganisms*, **7**, 14, (2019) <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- [9] Nenciarini, S., Renzi, S., di Paola, M., Meriggi, N., Cavalieri, D. Ascomycetes yeasts: The hidden part of human microbiome., *WIREs Mech. Dis.*, **7**, 1–33, (2024) <https://doi.org/10.1002/wsbm.1641>
- [10] Hooks, K.B., O’Malley, M.A. Dysbiosis and its discontents. *mBio*, **8**, 10–1128, (2017) <https://doi.org/10.1128/mbio.01492-17>

- [11] Martinez, J.E., Kahana, D.D., Ghuman, S., Wilson, H.P., Wilson, J., Kim, S.C.J., Lagishetty, V., Jacobs, J.P., Sinha-Hikim, A.P., Friedman, T.C. Unhealthy lifestyle and gut dysbiosis: A better understanding of the effects of poor diet and nicotine on the intestinal microbiome., *Front. Endocrinol.*, **12**, 649, (2021) <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.667066>
- [12] Sai, A., Shetty, G.B., Shetty, P., Nanjeshgowda, H.L. Influence of gut microbiota on autoimmunity: A narrative review., *Brain Behav. Immun. Integr.*, **5**, 100046, (2024) <https://doi.org/10.1016/j.bbii.2024.100046>
- [13] Di Paola, M., Rizzetto, L., Stefanini, I., Vitali, F., Massi-Benedetti, C., Tocci, N., Romani, L., Ramazzotti, M., Lionetti, P., De Filippo, C., Cavalieri, D. Comparative immunophenotyping of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida* spp. strains from Crohn's disease patients and their interactions with the gut microbiome., *J. Transl. Autoimmun.*, **3**, 100036, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2020.100036>
- [14] Mann, E.R., Li, X. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells., *World J. Gastroenterol.*, **20**, 9653–9664, (2014) DOI:10.3748/wjg.v20.i29.9653
- [15] Bachem, A., Makhlof, C., Binger, K.J., de Souza, D.P., Tull, D., Hochheiser, K., Whitney, P.G., Fernandez-Ruiz, D., Dähling, S., Kastenmüller, W., Jönsson, J., Gressier, E., Lew, A. M., Perdomo, C., Kupz, A., Figgett, W., Mackay, F., Oleshansky, M., Russ, B. E., Parish, I. A., Kallies, A., McConville, M. J., Turner, S. J., Gebhardt, T. & Bedoui, S. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote the memory potential of antigen-activated CD8+ T cells., *Immunity*, **51**, 285-297.e.5, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.002>
- [16] Alzabin, S., Venables, P.J. Etiology of autoimmune disease: Past, present and future., *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, **8**, 111–113, (2012) <https://doi.org/10.1586/eci.11.88>
- [17] Audo, R., Sanchez, P., Rivière, B., Mielle, J., Tan, J., Lukas, C., Macia, L., Morel, J. & Immediato Daien, C. Rheumatoid arthritis is associated with increased gut permeability and bacterial translocation that are reversed by inflammation control., *Rheumatology*, **62**, 1264-1271, (2023) <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keac454>
- [18] Blenkinsopp, H.C., Seidler, K. & Barrow, M. Microbial Imbalance and Intestinal Permeability in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: A Mechanism Review with a Focus on Bacterial Translocation, Citrullination, and Probiotic Intervention., *Journal of the American Nutrition Association*. **43**, 59-76, (2024) <https://doi.org/10.1080/27697061.2023.2211129>
- [19] Zhao, Z., Ren, J., Dai, C., Kannapell, C.C., Wang, H., Gaskin, F., Fu, S.M. Nature of T cell epitopes in lupus antigens and HLA-DR determines

- autoantibody initiation and diversification., *Ann. Rheum. Dis.*, **78**, 380–390, (2019) <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214125>
- [20] Willemze, A., van der Woude, D., Ghidey, W., Levarht, E.N., Stoeken-Rijsbergen, G., Verduyn, W., de Vries, R.R., Houwing-Duistermaat, J.J., Huizinga, T.W., Trouw, L.A., Toes, R.E. The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens., *Arthritis Rheum.*, **63**, 1823-1832, (2011) <https://doi.org/10.1002/art.30409>
- [21] Vossenaar, E.R., Zendman, A.J., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease., *Bioessays*, **25**, 1106–1118, (2003) <https://doi.org/10.1002/bies.10357>
- [22] Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Mechin, M.C. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation., *Arthritis Rheum.*, **56**, 3541-3553, (2007) <https://doi.org/10.1002/art.22983>
- [23] Lappin, D.F., Apatzidou, D., Quirke, A.M., Oliver-Bell, J., Butcher, J.P., Kinane, D.F., Riggio, M.P., Venables, P., McInnes, I.B., Culshaw, S. Influence of periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* and cigarette smoking on systemic anti- citrullinated peptide antibody titres., *J. Clin. Periodontol.*, **40**, 907-915, (2013) <https://doi.org/10.1111/jcpe.12138>
- [24] Blenkinsopp, H.C., Seidler, K., Barrow, M. Microbial imbalance and intestinal permeability in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: A mechanism review with a focus on bacterial translocation, citrullination, and probiotic intervention., *J. Am. Nutr. Assoc.*, **43**, 59-76, (2024) <https://doi.org/10.1080/27697061.2023.2211129>
- [25] Maresz, K.J., Hellvard, A., Sroka, A., Adamowicz, K., Bielecka, E., Koziel, J., Gawron, K., Mizgalska, D., Marcinska, K.A., Benedyk, M., Pyrc, K., Quirke, A., Jonsson, R., Alzabin, S., Venables, P.J., Nguyen, K., Mydel, P., Potempa, J. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD)., *PLoS Pathog.*, **9**, e1003627 (2013) <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003627>
- [26] Engström, M., Eriksson, K., Lee, L., Hermansson, M., Johansson, A., Nicholas, A.P., Gerasimcik, N., Lundberg, K., Klareskog, K., Catrina, A.I. & Yucel-Lindberg, T. Increase citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in gingival tissue of patients with periodontitis., *J. Transl. Med.*, **16**, 214, (2018) <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1588-2>
- [27] Kosgodage, U.S., Matewale, P., Mastroianni, G., Kraev, I., Brotherton, D., Awamaria, B., Nicholas, A.P., Lange, S., Inal, J.M. Peptidylarginine deiminase inhibitors reduce bacterial membrane vesicle release and sensitize bacteria to

- antibiotic treatment., *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **9**, 227, (2019) <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00227>
- [28] Weawsiangsang, S., Rattanachak, N., Jongjitvimol, T., Jaifoo, T., Charoensit, P., Viyoch, J., Jongjitwimol, J. Hydroquinine inhibits the growth of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* via the suppression of the arginine deiminase pathway genes., *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 13914, (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms241813914>
- [29] Cummings, T.F.M., Gori, K., Sanchez-Pulido, L., Gavriilidis, G., Moi, D., Wilson, A.R., Murchison, E., Dessimoz, C., Ponting, C.P., Christophorou, M.A. Citrullination was introduced into animals by horizontal gene transfer from cyanobacteria., *Mol. Biol. Evol.*, **39**, msab317, (2021) DOI:10.1093/molbev/msab317
- [30] Jung, H., Jung, S.M., Rim, Y.A., Park, N., Nam, Y., Lee, J., Park, S.-H., Ju, J.H. Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice., *PLoS ONE*, **12**, e0188698, (2017) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188698>
- [31] Lac, P., Saunders, S., Tutunea-Fatan, E., Barra, L., Bell, D.A., Cairns, E. Immune responses to peptides containing homocitrulline or citrulline in the DR4-transgenic mouse model of rheumatoid arthritis., *J. Autoimmun.*, **89**, 75–81, (2018) <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.002>
- [32] Engdahl, C., Bang, H., Dietel, K., Lang, S.C., Harre, U., Schett, G. Periarticular bone loss in arthritis is induced by autoantibodies against citrullinated vimentin., *J. Bone Min. Res.*, **32**, 1681–1691, (2017) <https://doi.org/10.1002/jbmr.3158>
- [33] Dusad, A., Duryee, M.J., Shaw, A.T., Klassen, L.W., Anderson, D.R., Wang, D., Ren, K., Gravallese, E.M., O’Dell, J.R., Mikuls, T.R. Induction of bone loss in DBA/1J mice immunized with citrullinated autologous mouse type II collagen in the absence of adjuvant., *Immunol. Res.*, **58**, 51-60, (2014) <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8479-7>
- [34] Arnoux, F., Mariot, C., Peen, E., Lambert, N.C., Balandraud, N., Roudier, J., Auger, I. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10169–E10177 (2017) <https://doi.org/10.1073/pnas.1713112114>
- [35] Castillo, D.M. Lafaurie, G.I., Romero-Sánchez, C., Delgadillo, N.A., Castillo Y., Bautista-Molano, W., Pacheco-Tena, C.; Bello-Gualtero, J.M., Chalem-Choueka, P., Castellanos, J.E. The Interaction Effect of Anti-RgpA and Anti-PPAD Antibody Titers: An Indicator for Rheumatoid Arthritis Diagnosis., *J. Clin. Med.*, **12**, 3027, (2023) <https://doi.org/10.3390/jcm12083027>
- [36] Kho, Z. Y., Lal, S. K. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease., *Front. Microbiol.*, **9**, 1835, (2018) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>

- [37] Hou, K., Wu, Z.X., Chen, X.Y. Wang, J.Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J. & Chen, Z.S. Microbiota in health and diseases. *Sig. Transduct. Target Ther*, **7**, 135 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- [38] Sasso, J.M., Ammar, R.M., Tenchov, R., Lemmel, S., Kelber, O., Grieswelle, M., Zhou, Q.A. Gut Microbiome–Brain Alliance: A Landscape View into Mental and Gastrointestinal Health and Disorders., *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 1717–1763, (2023) <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00127>
- [39] Manson, J.M., Rauch, M., Gilmore, M.S. The Commensal Microbiology of the Gastrointestinal Tract. In: Huffnagle, G.B., Noverr, M.C. (eds) GI Microbiota and Regulation of the Immune System. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **635**, (2008) https://doi.org/10.1007/978-0-387-09550-9_2
- [40] Ghosh, S. y Pramanik, S. Structural diversity, functional aspects and future therapeutic applications of human gut microbiome., *Arch. Microbiol.*, **203**, 5281–5308, (2021) <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02516-y>
- [41] Shah, H. N., Olsen, I., Bernard, K., Finegold, S. M., Gharbia, S., Gupta, R. S. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, Gram-negative, non-sporeforming rods: Current status and perspectives., *Anaerobe*, **15**, 179–194, (2009) <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.003>
- [42] Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection., *Front. Microbiol.*, **2**, 93, (2011) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- [43] McKee, L. S., La Rosa, S. L., Westereng, B., Eijsink, V. G., Pope, P. B., Larsbrink, J. Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: mechanisms and nomenclature, *Environ., Microbiol. Rep.*, **13**, 559–581, (2021) <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12980>
- [44] Yang, M., Gu, Y., Li, L., Liu, T., Song, X., Sun, Y., Cao, X., Wang, B., Jiang, K., Cao, H. Bile Acid–Gut Microbiota Axis in Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside., *Nutrients*, **13**, 3143, (2021) <https://doi.org/10.3390/nu13093143>
- [45] Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., Margolles, A. Bifidobacteria and Their HealthPromoting Effects., *Microbiol Spectr.*, **5**, 5.3.21, (2017) <https://doi.org/10.1128/9781555819705.ch3>
- [46] Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Wezel, G. P. v. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria., *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, **80**, 1–43, (2016) <https://doi.org/10.1128/mmbr.00019-15>
- [47] Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., Gasbarrini, A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases., *BioMed. Research International.*, **2017**, (2017) <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>

- [48] Geerlings, S. Y., Ouwerkerk, J. P., Koehorst, J. J., Ritari, J., Aalvink, S., Stecher, B., Schaap, P. J., Paulin, L., de Vos, W. M., Belzer, C. Genomic convergence between *Akkermansia muciniphila* in different mammalian hosts., *BMC Microbiol.*, **21**, 298, (2021) <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02360-6>
- [49] Liu, M.-J., Yang, J.-Y., Yan, Z.-H., Hu, S., Li, J.-Q., Xu, Z.-X., Jian, Y.-P. Recent findings in *Akkermansia muciniphila*-regulated metabolism and its role in intestinal diseases., *Clin. Nutr.*, **41**, 2333–2344, (2022) <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.08.029>
- [50] Gupta, R. S., Sethi, M. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades., *Anaerobe.*, **28**, 182–198, (2014) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.007>
- [51] Cresci, G. A. M. & Izzo, K. Gut Microbiome. In Adult Short Bowel Syndrome., *Academic Press.*, 45–54, (2019) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814330-8.00004-4>
- [52] Singh, S., & Shankar, Microbial metagenomics: potential and challenges. In Advances in animal genomics., *Academic Press.*, 109-122, (2021) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820595-2.00008-4>
- [53] Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D. Role of the normal gut microbiota., *World J. Gastroenterol.*, **21**, 8787–8803, (2015) DOI:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- [54] Shaffer, J. P., Carpenter, C. S., Martino, C., Salido, R. A., Minich, J. J., Bryant, M., Sanders, K., Schwartz, T., Humphrey, G., Swafford, A.D. & Knight, R. A comparison of six DNA extraction protocols for 16S, ITS and shotgun metagenomic sequencing of microbial communities. *Biotechniques*, **73**, 34-46, (2022) <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0032>
- [55] Finegold, S. M., Attebery, H. R., & Sutter, V. L. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *The American journal of clinical nutrition*, **27**, 1456-1469, (1974) <https://doi.org/10.1093/ajcn/27.12.1456>
- [56] Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. & Núñez, G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease., *Immunol. Rev.*, **279**, 70–89, (2017) <https://doi.org/10.1111/imr.12567>
- [57] Staley, C., Weingarden, A. R., Khoruts, A. & Sadowsky, M. J. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 47–64, (2017) <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6>
- [58] Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M. & Nelson, K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome., *Science.*, **312**, 1355–1359, (2006) DOI:10.1126/science.1124234

- [59] Oliphant, K. & Allen-Vercoe, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health., *Microbiome.*, **7**, 91, (2019) <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- [60] Magnúsdóttir, S., Ravcheev, D., de Crécy-Lagard, V., Thiele, I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes., *Frontiers in Genetics.*, **6**, 148, (2015) <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00148>.
- [61] Dierikx T.H., Visser D.H., Benninga M.A., van Kaam A.H.L.C., de Boer N.K.H., de Vries R., van Limmergen, J., de Meij, T.G.J. The Influence of Prenatal and Intrapartum Antibiotics on Intestinal Microbiota Colonisation in Infants: A Systematic Review., *J Infect.*, **2**, 81, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.002>
- [62] Garcia-Mantrana I., Selma-Royo M., González S., Parra-Llorca A., Martínez-Costa C., Collado M.C. Distinct Maternal Microbiota Clusters are Associated With Diet During Pregnancy: Impact on Neonatal Microbiota and Infant Growth During the First 18 Months of Life., *Gut Microbes.*, **11**, 962-78, (2020) <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1730294>
- [63] Vatanen, T., Jabbar, K.S., Ruohtula, T., Honkanen, J., Avila-Pacheco, J., Siljander, H., Strazar, M., Oikarinen, S., Hyöty, H., Ilonen, J., Mitchel, C.M., Yassour, M., Viertanen, S.M., Clish, C.B., Plichta, D.R., Vlamakis, H., Knip, M., Xavier, R.J. Mobile genetic elements from the maternal microbiome shape infant gut microbial assembly and metabolism., *Cell*, **185**, 4921-4936. e4915, (2022) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.023>
- [64] Goodrich, J. K., Davenport, E.R., Beaumont, M., Jackson, M.A., Knight, R., Ober, C., Spector, T.D., Bell, J.T., Clark, A.G., Ley, R.E. Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins., *Cell Host Microbe.*, **19**, 731-43, (2016) doi: 10.1016/j.chom.2016.04.017.
- [65] Dominguez-Bello, M. G.; Costello, E. K.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Fierer, N.; Knight, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 11971-11975, (2010) <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- [66] Ma, J., Li, Z., Zhang, W., Zhang, C., Zhang, Y., Mei, H., Zhuo, N., Wang, H., Wang, L. & Wu, D. Comparison of Gut Microbiota in Exclusively Breast-Fed and Formula-Fed Babies: A Study of 91 Term Infants., *Sci Rep.*, **10**, 15792, (2020) <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72635-x>
- [67] Russell, S.L., Gold, M.J., Hartmann, M., Willing, B.P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M-R., Mohn, W.W., McNagny, K.M., & Finlay B.B. Early Life Antibiotic-Driven Changes in Microbiota Enhance Susceptibility to Allergic Asthma., *EMBO Rep.*, **13**, 440-7, (2012) <https://doi.org/10.1038/embor.2012.32>

- [68] Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate-Rodríguez J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P., Blaser, M.J. Altering the Intestinal Microbiota During a Critical Developmental Window has Lasting Metabolic Consequences., *Cell.*, **158**, 705–21, (2014) [10.1016/j.cell.2014.05.052](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052)
- [69] Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., Déjardin, F., Sparwasser, T., Bérard, M., Cerf-Bensussan, N. & Eberl, G. A Weaning Reaction to Microbiota is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult., *Immunity.*, **50**, 1276–88.e5, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.014>
- [70] Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenot, L.T. & Ley, R.E. Succession of Microbial Consortia in the Developing Infant Gut Microbiome., *Proc Natl Acad Sci.*, **108**, 4578–85, (2011) <https://doi.org/10.1073/pnas.100008110>
- [71] Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidelgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R. & Gordon, J.I. Human Gut Microbiome Viewed Across Age and Geography., *Nature.*, **486**, 222–7, (2012) <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- [72] Baleato, C. L., Ferguson, J. J. A., Oldmeadow, C., Mishra, G. D. & Garg, M. L. Plant-Based Dietary Patterns versus Meat Consumption and Prevalence of Impaired Glucose Intolerance and Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Study in Australian Women., *Nutrients*, **14**, 4152, (2022) <https://doi.org/10.3390/nu14194152>
- [73] Keaver, L., Ruan, M., Chen, F., Du, M., Ding, C., Wang, J., Shan, Z., Liu, J., Zhang, F. F. Plant- and animal-based diet quality and mortality among US adults: a cohort study., *Br. J. Nutr.*, **125**, 1405–1415, (2021) [doi:10.1017/S0007114520003670](https://doi.org/10.1017/S0007114520003670)
- [74] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. Elsevier, 10th edition, 2021.
- [75] Gill, N., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ., *Nature immunology.*, **11**, 558-560, (2010) <https://doi.org/10.1038/ni0710-558>
- [76] Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function., *Mucosal immunology.*, **14**, 793-802, (2021) <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- [77] Martens, E.C., Neumann, M., Desai, M.S. Interactions of Commensal and Pathogenic Microorganisms With the Intestinal Mucosal Barrier., *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 70-457, (2018) <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0036-x>

- [78] Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodriguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F. & Hansson, G.C. Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization., *Cell Host Microbe.*, **5**, 92- 582, (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>
- [79] Senda, T., Dogra, P., Granot, T., Furuhashi, K., Snyder, M.E., Carpenter, D.J., Szabo, P.A., Thapa, P., Miron, M., Farber, D.L. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life., *Mucosal Immunol.*, **12**, 378–389, (2019) <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0110-8>
- [80] Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system., *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 667-685, (2014) <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- [81] Kooij, I. A., Sahami, S., Meijer, S.L., Buskens, C.J., te Velde, A.A. The immunology of the vermiform appendix: a review of the literature., *Clin. Exp. Immunol.*, **186**, 1–9, (2016) <https://doi.org/10.1111/cei.12821>
- [82] Farris, A. B., Lauwers, G. Y., Ferry, J. A. & Zukerberg, L. R. The rectal tonsil: a reactive lymphoid proliferation that may mimic lymphoma., *Am. J. Surg. Pathol.*, **32**, 1075–1079, (2008). DOI: 10.1097/PAS.0b013e318162c3ec
- [83] Hong, J. B., Kim, H.W. Kang, D.H., Choi, C.W., Park, S.B., Kim, D.J., Ji, B.H. & Koh, K.W. Rectal tonsil: a case report and literature review., *World J. Gastroenterol.*, **21**, 2563–2567, (2015) doi: 10.3748/wjg.v21.i8.2563
- [84] Junt, T., Scandella, E. & Ludewig, B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence., *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 764-775, (2008) <https://doi.org/10.1038/nri2414>
- [85] Owen, R. L. & Jones, A.L. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles., *Gastroenterol.*, **66**, 189-203, (1974) [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(74\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(74)80102-2)
- [86] Gullberg, E., Leonard, M., Karlsoon, J., Hopkins, A.M., Brayden, D., Baird, A.W., Artursson, P. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 808-813, (2000) <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4038>
- [87] Brandtzaeg, P. & Bjerke, K. Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches., *Digestion.*, **46**, 262-273, (1990) <https://doi.org/10.1159/000200396>
- [88] Farstad, I. N., Halstensen, T. S., Fausa, O. & Brandtzaeg, P. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches., *Immunol.*, **83**, 457, 464, (1994) PMID: 7835971 PMC1415048
- [89] Barone, F., Patel, P., Sanderson, J.D. & Spencer, J. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-

- independent class switch recombination., *Mucosal Immunol*, **2**, 495-503, (2009) <https://doi.org/10.1038/mi.2009.106>
- [90] Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S. & Gorvel, J.P. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores., *Gastroenterol.*, **142**, 592-601.e3, (2012) <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.039>
- [91] Spencer, J., Finn, T. & Isaacson, P. G. Human Peyer's patches: a immunohistochemical study., *Gut*, **27**, 405-410, (1986) <https://doi.org/10.1136/gut.27.4.405>
- [92] Spencer, J., Siu, J. H. Y. & Montorosi, L. Human intestinal lymphoid tissue in time and space., *Mucosal Immunol.*, **12**, 296-298, (2019) <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0120-6>
- [93] Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cell: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes., *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 118-132, (2013) <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- [94] Botía-Sánchez, M., Alarcón-Riquelme, M.E., Galicia, G., B Cells and Microbiota in Autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4846, (2021) <https://doi.org/10.3390/ijms22094846>
- [95] Farstad, I. N., Halstensen, T. S., Kvale, D., Fausa, O. & Brandtzaeg, P. Topographic distribution of homing receptor on B and T cells in human gut-associated lymphoid tissue: relation of L-selectin and integrin alpha 4 beta 7 to naive and memory phenotypes., *Am. J. Pathol.*, **150**, 187-199, (1997) PMC1858530 PMID: 9006335
- [96] Fenton, T. M., Jørgensen, P.B., Niss, K., Rubin, S.J.S., Mörbe, U.M., Riis, L.B., Da Silva, C., Plumb, A., Vandamme, J., Jakobsen, H.L., Brunak, S., Habtezion, A., Nielsen, O.H., Johansson-Lindbom, B. & Agace, W.W. Immune profiling of human gut-associated lymphoid tissue identifies a role for isolated lymphoid follicles in priming of region-specific immunity., *Immunity*, **52**, 557-570.e6, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.001>
- [97] Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J.H.Y., Tull, T.J., Sanderson, J.D., Wu, Y-C.B., Zhou, J.Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., Chavele, K-M., Guesdon, W., Vossenkämper, A., Jassem, W., D'Cruz, D.P., Fear, D.J., John, S., Scheel-Toellner, D., Hopkins, C., Moreno, E., Woodman, N.L., Ciccarelli, F., Heck, S., Kleinstein, S.H., Bemark, M. & Spencer, J. Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue., *Nat. Commun.*, **9**, 3857, (2018) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06089-1>
- [98] Vossenkämper, A., Blair, P.A., Safinia, N., Fraser, L.D., Das, L., Sanders, T.J., Stagg, A.J., Sanderson, J.D., Taylor, K., Chang, F., Choong, L.M., D'Cruz, D.P., MacDonald, T.T., Lombardi, G., Spencer, J. A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire., *J. Exp. Med.*, **210**, 1616-1674, (2013) <https://doi.org/10.1084/jem.20122465>

- [99] Vojdani, A., Vojdani, E., & Kharrazian, D. Fluctuation of zonulin levels in blood vs stability of antibodies., *World journal of gastroenterology.*, **23**, 5669, (2017) doi: 10.3748/wjg.v23.i31.5669
- [100] Yu, Y-B & Li, Y-Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier., *World J Gastroenterol.*, **20**, 11273-11280, (2014) doi:10.3748/wjg.v20.i32.11273
- [101] Zihni, C.; Mills, C., Matter, K., Balda, M.S. Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 564–580, (2016) <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
- [102] Bischoff, S.C., Barbara, G.; Buurman, W.; Ockhuizen, T.; Schulzke, J.-D.; Serino, M.; Tilg, H.; Watson, A.; Wells, J.M. Intestinal permeability—A new target for disease prevention and therapy., *BMC Gastroenterol.*, **14**, 189, (2014) <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- [103] Bhat, M.I.; Sowmya, K.; Kapila, S.; Kapila, R. Escherichia Coli K12: An Evolving Opportunistic Commensal Gut Microbe Distorts Barrier Integrity in Human Intestinal Cells., *Microb. Pathog.*, **133**, 103545, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103545>
- [104] Nava, P., Vidal, J.E. The CpAL System Regulates Changes of the Trans-Epithelial Resistance of Human Enterocytes during Clostridium Perfringens Type C Infection., *Anaerobe.*, **39**, 143–149, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.002>
- [105] Maia-Brigagão, C., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W. Giardia Disrupts the Arrangement of Tight, Adherens and Desmosomal Junction Proteins of Intestinal Cells., *Parasitol. Int.*, **61**, 280–287, (2012) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.11.002>
- [106] Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., González, S., Cereijido, M., Matter, K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apicalbasolateral intramembrane diffusion barrier by expression of mutant tight junction membrane protein., *J. Cell Biol.*, **134**, 1031-1049, (1996) <https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.1031>
- [107] Sakaguchi, T., Köhler, H., Gu, X., McCormick, B.A., Reinecker, H.-C. Shigella Flexneri Regulates Tight Junction-Associated Proteins in Human Intestinal Epithelial Cells., *Cell. Microbiol.*, **4**, 367–381, (2002) <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00197.x>
- [108] Scott, K.G-E., Meddings, J.B., Kirk, D.R., Lees-Miller, S.P., Buret, A.G. Intestinal Infection with Giardia Spp. Reduces Epithelial Barrier Function in a Myosin Light Chain Kinase-Dependent Fashion., *Gastroenterol.*, **123**, 1179–1190, (2002) <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36002>
- [109] Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A., Dermody, T.S. Junction Adhesion Molecule Is a

- Receptor for Reovirus., *Cell.*, **104**, 441–451, (2001) [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00231-8)
- [110] Deshpande, N.P., Wilkins, M.R., Castaño-Rodríguez, N., Bainbridge, E., Sodhi, N., Riordan, S.M., Mitchell, H.M., Kaakoush, N.O. Campylobacter Concisus Pathotypes Induce Distinct Global Responses in Intestinal Epithelial Cells., *Sci. Rep.*, **6**, 34288, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep34288>
- [111] Kawauchiya, T., Takumi, R., Kudo, Y., Takamori, A., Sasagawa, T., Takahashi, K., Kikuchi, H. Correlation between the Destruction of Tight Junction by Patulin Treatment and Increase of Phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 Human Colon Cancer Cells., *Toxicol. Lett.*, **205**, 196-202, (2011) <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.06.006>
- [112] Buret, A.G.; Chin, A.C.; Scott, K.G.E. Infection of Human and Bovine Epithelial Cells with Cryptosporidium Andersoni Induces Apoptosis and Disrupts Tight Junctional ZO-1: Effects of Epidermal Growth Factor., *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1363–1371, (2003) [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00138-3)
- [113] Schmidt, E., Kelly, S.M., van der Walle, C.F. Tight Junction Modulation and Biochemical Characterization of the Zonula Occludens Toxin C-and N-Termini., *FEBS Lett.*, **581**, 2974–2980, (2007) <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.051>
- [114] Beatty, J.K. Akierman, S.V., Motta, J.-P., Muise, S., Workentine, M.L., Harrison, J.J., Bhargava, A., Beck, P.L., Rioux, K.P., McKnight, G.W., Wallace, J.L., Buret, A.G. Giardia Duodenalis Induces Pathogenic Dysbiosis of Human Intestinal Microbiota Biofilms., *Int. J. Parasitol.*, **47**, 311-326, (2017) <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.11.010>
- [115] Assunção, R., Alvito, P., Kleiveland, C.R., Lea, T.E. Characterization of in Vitro Effects of Patulin on Intestinal Epithelial and Immune Cells., *Toxicol. Lett.*, **250**, 47–56, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.007>
- [116] Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Livrelli, V., Viscogliosi, E., Delbac, F., Poirier, P. On Blastocystis Secreted Cysteine Proteases: A Legumain-Activated Cathepsin B Increases Paracellular Permeability of Intestinal Caco-2 Cell Monolayers., *Parasitology.*, **143**, 1713-1722, (2016) [doi:10.1017/S0031182016001396](https://doi.org/10.1017/S0031182016001396)
- [117] Cuellar, P., Hernández-Nava, E., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Betanzos, A., Orozco, E. Entamoeba Histolytica EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium., *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 372, (2017) <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00372>
- [118] Paradis, T., Bègue, H., Basmaciyan, L., Dalle, F., & Bon, F. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells.,» *International*

Journal of Molecular Sciences., **22**, 2506, (2021)
<https://doi.org/10.3390/ijms22052506>

- [119] Radhakrishnan, G.K., Splitter, G.A. Modulation of Host Microtubule Dynamics by Pathogenic Bacteria., *Biomol. Concepts.*, **3**, 571–580, (2012)
<https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0030>
- [120] Roxas, J.L. & Viswanathan, V.K. Modulation of Intestinal Paracellular Transport by Bacterial Pathogens., *Comprehensive Physiology.*, **8**, 823–842, (2018) <https://doi.org/10.1002/cphy.c170034>
- [121] Ramalingam, S., Bahuguna, A., Kim, M. The Effects of Mycotoxin Patulin on Cells and Cellular Components., *Trends Food Sci. Technol.*, **83**, 99–113, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.010>
- [122] Chen, M.L., Pothoulakis, C., LaMont, J.T. Protein Kinase C Signaling Regulates ZO-1 Translocation and Increased Paracellular Flux of T84 Colonocytes Exposed to Clostridium Difficile Toxin., *A. J. Biol. Chem.*, **277**, 4247–4254, (2002) <https://doi.org/10.1074/jbc.M109254200>
- [123] Fasano, A., Fiorentini, C., Donelli, G., Uzzau, S., Kaper, J.B., Margaretten, K., Ding, X., Guandalini, S., Comstock, L., Goldblum, S.E. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro., *J Clin Invest.*, **96**, 710-720, (1995) 10.1172/JCI118114
- [124] Anderson, J.M., Van Itallie, C.M. Physiology and function of the tight junction., *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **1**, (2009) doi:10.1101/cshperspect.a002584
- [125] Wang, W., Uzzau, S., Goldblum, S.E., Fasano, A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions., *J. Cell Sci.*, **113**, 4435–4440, (2000) <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4435>
- [126] Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A., Goldblum, S.E. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease., *Lancet*, **355**, 1518–1519, (2000) [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02169-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02169-3)
- [127] El Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G.V., Catassi, C., Fasano, A. Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure., *Gastroenterology.*, **123**, 1607–1615, (2002) <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36578>
- [128] Tripathi, A., Lammers, K.M., Goldblum, S., Shea-Donohue, T., Netzel-Arnett, S., Buzza, M.S., Antalis, T.M., Vogel, S.N., Zhao, A., Yang, S. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 16799-16804, (2009) <https://doi.org/10.1073/pnas.0906773106>

- [129] Veres-Székely, A., Szász, C., Pap, D., Szebeni, B., Bokrossy, P., Vannay, Á. Zonulin as a Potential Therapeutic Target in Microbiota-Gut-Brain Axis Disorders: Encouraging Results and Emerging Questions., *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 7548, (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms24087548>
- [130] Bandara, M., MacNaughton, W.K. Protease-activated receptor-2 activation enhances epithelial wound healing via epidermal growth factor receptor., *Tissue Barriers*, **10**, 1968763, (2022) <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1968763>
- [131] van der Merwe, J.Q., Hollenberg, M.D. & MacNaughton, W.K. EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells., *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, **294**, 441–451, 2008. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00303.2007>
- [132] Yarden, Y. & Shilo, B.-Z. SnapShot: Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway., *Cell*, **131**, 1018.e1–1018.e2, (2007) DOI 10.1016/j.cell.2007.11.013
- [133] Fasano, A. Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **10**, 1096–1100, (2012) <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.08.012>
- [134] Huang, L. & Fu, L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors., *Acta Pharm. Sin. B.*, **5**, 390–401, (2015) <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.001>
- [135] Yang, Q., Zhang, X.-F., Van Goor, D., Dunn, A.P., Hyland, C., Medeiros, N., Forscher, P. Protein kinase C activation decreases peripheral actin network density and increases central nonmuscle myosin II contractility in neuronal growth cones., *Mol. Biol. Cell.*, **24**, 3097–3114, (2013) <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0289>
- [136] Veres-Székely, A., Bernáth, M., Pap, D., Rokonay, R., Szebeni, B., Takács, I.M., Lippai, R., Cseh, Á., Szabó, A.J., Vannay, Á. PARK7 Diminishes Oxidative Stress-Induced Mucosal Damage in Celiac Disease., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2020**, (2020) <https://doi.org/10.1155/2020/4787202>
- [137] Heickman, L.K.W., DeBoer, M.D. & Fasano, A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity., *Diabetes/Metabolism Res. Rev.*, **36**, e3309, (2020) <https://doi.org/10.1002/dmrr.3309>
- [138] Zhang, C., Deng, Y., Zhang, Y., Ba, T., Niu, S., Chen, Y., Gao, Y., Dai, H. CXCR3 Inhibition Blocks the NF-κB Signaling Pathway by Elevating Autophagy to Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Dysfunction in Mice., *Cells*, **12**, 182, (2023) <https://doi.org/10.3390/cells12010182>
- [139] Hoilat, G.J., Altowairqi, A.K., Ayas, M.F., Alhaddab, N.T., Alnujaidi, R.A., Alharbi, H.A., Alyahyawi, N., Kamal, A.; Alhabeeb, H., Albazee, E., Almustanyir, S., Abu-Zaid, A. Larazotide acetate for treatment of celiac

- disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trails., *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, **46**, (2022) <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101782>
- [140] Mayer, E. A., Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F., Tillisch, K. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience., *J. Neurosci.*, **34**, 15490–15496, (2014) <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
- [141] Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F. The microbiome-gutbrain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner., *Mol. Psychiatry.*, **18**, 666-673, (2013) <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- [142] Cryan J.F., O’Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K.V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A.V., Guzzetta, K.E., Jaggar, M., Long-Smith, C.M., Lyte, J.M., Martin, J.A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., O’Connor, R., Cruz-Pereira, J.S., Peterson, V.L., Rea, K., Ritz, N.L., Sherwin, E., Spichak, S., Teichman, E.M., van de Wouw, M., Ventura-Silva, A.P., Wallace-Fitzsimons, S.E., Hyland, N., Clarke, G. & Dinan, T.G. The microbiota–gut–brain axis., *Physiological reviews.*, (2019) <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- [143] Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The impact of gut microbiota on brain and behaviour: implications for psychiatry., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **18**, 552–558, (2015) DOI: 10.1097/MCO.0000000000000221
- [144] Rutsch, A., Kantsjö, J. B., Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology., *Front. Immunol.*, **11**, 604179, (2020). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- [145] Luissint, A.C., Parkos, C.A., Nusrat, A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair., *Gastroenterology.*, **151**, 616–632, (2016) <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.008>
- [146] Doran, K.S., Banerjee, A., Disson, O., Lecuit, M. Concepts and mechanisms: crossing host barriers., *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **3**, a010090, (2013) doi:10.1101/cshperspect.a010090
- [147] Ribet, D., Cossart, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues., *Microbes Infect.*, **17**, 173–183, (2015) <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
- [148] König, J., Wells, J., Cani, P.D., Garcia-Rodenas, C.L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., Brummer, R.J. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol.*, **7**, e196, (2016) doi:10.1038/ctg.2016.54
- [149] France, M.M., Turner, J.R.. The mucosal barrier at a glance. *J. Cell. Sci.*, **130**, 307–314, (2017) <https://doi.org/10.1242/jcs.193482>

- [150] Odenwald, M.A., Turner, J.R., The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **14**, 9–21, (2017) doi:10.1038/nrgastro.2016.169
- [151] Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C., Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* **141**, 769–776, (2011) doi:10.3945/jn.110.135657
- [152] Fine, R. L., Manfredo Vieira, S., Gilmore, M. S., & Kriegel, M. A. Mechanisms and consequences of gut commensal translocation in chronic diseases., *Gut Microbes.*, **11**, 217-230, (2020) <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1629236>
- [153] Llorente, C., Jepsen, P., Inamine, T., Wang, L., Bluemel, S., Wang, H.J., Loomba, R., Bajaj, J.S., Schubert, M.L., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., Xu, J., Kisseleva, T., Ho, S.B., DePew, J., Du, X., Sørensen, H.T., Vilstrup, H., Nelson, K.E., Brenner, D.A., Fouts, D.E. & Schnabl, B. Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal enterococcus. *Nat Commun.*, **8**, 837, (2017) doi:10.1038/s41467-017-00796-x.
- [154] Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillere, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Apetoh, L., Chachaty, E., Woerther, P-L., Eberl, G., Bérard, M., Ecobichon, C., Clermont, D., Bizet, C., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., Opolon, P., Yessaad, N., Vivier, E., Ryffel, B., Elson, C.O., Doré, J., Kroemer, G., Lepage, P., Boneca, I.G., Ghiringhelli, F. & Zitvogel, L. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science.*, **342**, 971–976, (2013) doi:10.1126/science.1240537 .
- [155] Meisel, M., Hinterleitner, R., Pacis, A., Chen, L., Earley, Z.M., Mayassi, T., Pierre, J.F., Ernest, J.D., Galipeau, H.J., Thuille, N., Bouziat, R., Buscarlet, M., Ringus, D.L., Wang, Y., Li, Y., Dinh, V., Kim, S.M., McDonald, B.D., Zurenski, M.A., Musch, M.W., Furtado, G.C., Lira, S.A., Baier, G., Chang, E.B., Eren, A.M., Weber, C.R., Busque, L., Godley, L.A., Verdú, E.F., Barreiro, L.B. & Jabri, B. Microbial signals drive pre-leukaemic myeloproliferation in a tet2-deficient host. *Nature.*, **557**, 580–584, (2018) doi:10.1038/s41586-018-0125-z
- [156] Macpherson, A.J. & Uhr, T. Induction of protective iga by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.*, **303**, 1662–1665, (2004) doi:10.1126/ science.1091334.
- [157] Fung, T.C., Bessman, N.J., Hepworth, M.R., Kumar, N., Shibata, N., Kobuley, D., Wang, K., Ziegler, C.G.K., Goc, J., Shima, T. Lymphoid-tissue-resident commensal bacteria promote members of the il-10 cytokine family to establish mutualism. *Immunity.*, **44**, 634–646, (2016) doi:10.1016/j.immuni.2016.02.019 .

- [158] Cywes, C., Wessels, M.R. Group a streptococcus tissue invasion by cd44-mediated cell signalling. *Nature*. **414**, 648–652, (2001) [https://doi:10.1038/414648a](https://doi.org/10.1038/414648a).
- [159] Manfredo Vieira, S., Hiltensperger, M., Kumar, V., Zegarra-Ruiz, D., Dehner, C., Khan, N., Costa, F.R.C., Tiniakou, E., Greiling, T., Ruff, W., Barbieri, A., Kriegel, C., Mehta, S.S., Knight, J.R., Jain, D., Goodman, A.L. & Kriegel, M.A. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science*. **359**, 1156–1161, (2018) [doi:10.1126/science.aar7201](https://doi.org/10.1126/science.aar7201).
- [160] Mainous, M.R., Tso, P., Berg, R.D., Deitch, E.A. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation., *Arch Surg.*, **126**, 33–37, (1991) [doi:10.1001/archsurg.1991.01410250037005](https://doi.org/10.1001/archsurg.1991.01410250037005)
- [161] Gautreaux, M.D., Deitch, E.A., Berg, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal-tract to various segments of the mesenteric lymph-node complex., *Infect Immun.*, **62**, 132–2134, (1994) <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2874-2884.1994>
- [162] Spadoni, I., Pietrelli, A., Pesole, G., Rescigno, M. Gene expression profile of endothelial cells during perturbation of the gut vascular barrier. *Gut Microbes.*, **7**, 540–548, (2016) [doi:10.1080/19490976.2016.1239681](https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1239681)
- [163] Wolochow, H., Hildebrand, G.J., Lamanna, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J. Infect. Dis.*, **116**, 523–528, (1966) [doi:10.1093/infdis/116.4.523](https://doi.org/10.1093/infdis/116.4.523)
- [164] Lynskey, N.N., Banerji, S., Johnson, L.A., Holder, K.A., Reglinski, M., Wing, P.A., Rigby, D., Jackson, D.G., Sriskandan, S. Rapid lymphatic dissemination of encapsulated group a streptococci via lymphatic vessel endothelial receptor-1 interaction. *PLoS Pathog.*, **11**, e1005137, (2015) [doi:10.1371/journal.ppat.1005137](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005137)
- [165] Spadoni, I., Zagato, E., Bertocchi, A., Paolinelli, R., Hot, E., Di Sabatino, A., Caprioli, F., Bottiglieri, L., Oldani, A., Viale, G., Penna, G., Dejana, E. & Rescigno, M. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science.*, **350**, 830–834, (2015) [doi:10.1126/science.aad0135](https://doi.org/10.1126/science.aad0135)
- [166] Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A.E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., Bernsmeier, C., Ronchi, F., Wyss, M., Stroka, D., Dickgreber, N., Heim, M.H., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med.*, **6**, 237ra66–237ra66, (2014) [doi:10.1126/scitranslmed.3008618](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008618)
- [167] Zegarra-Ruiz, D.F., El Beidaq, A., Iniguez, A.J., Lubrano, Di Ricco, M., Manfredo Vieira, S., Ruff, W.E., Mubiru, D., Fine, R.L., Sterpka, J., Greiling, T.M., Dehene, C. & Kriegel, M.A. A diet-sensitive commensal lactobacillus

- strain mediates tlr7-dependent systemic autoimmunity. *Cell Host Microbe.*, **25**, 113– 27e6, (2019) doi:10.1016/j.chom.2018.11.009
- [168] Chakraborty, R., Lam, V., Kommineni, S., Stromich, J., Hayward, M., Kristich, C.J., Salzman, N.H. Ceftriaxone administration disrupts intestinal homeostasis, mediating noninflammatory proliferation and dissemination of commensal enterococci. *Infect Immun*, **86**, 10-1128, (2018) doi:10.1128/IAI.00674-18
- [169] Nakamoto, N., Sasaki, N., Aoki, R., Miyamoto, K., Suda, W., Teratani, T., Suzuki, T., Koda, Y., Chu, P.S., Taniki, N., Yamaguchi, A., Kanamori, M., Kamada, N., Hattori, M., Ashida, H., Sakamoto, M., Atarashi, K., Narushima, S., Yoshimura, A., Honda, K., Sato, T. & Kanai, T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver t helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol*, **4**, 492-503, (2019) doi:10.1038/s41564-018-0333-1.
- [170] Davidson, A., Diamond, B. Autoimmune diseases., *N. Engl. J. Med.*, **345**, 340–350, (2001) [https:// DOI:10.1056/NEJM200108023450506](https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450506)
- [171] Belkaid, Y. & Hand, T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, **157**, 121–141, (2014) [https://DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011)
- [172] Gury-BenAri, M., Thaïss, C. A., Serafini, N., Winter, D. R., Giladi, A., Lara-Astiaso, D., Levy, M., Salame, T. M., Weiner, A., David, E., Shapiro, H., Dori-Bachash, M., Pevsner-Fischer, M., Lorenzo-Vivas, E. Hadas Keren-Shaul, H., Paul, F., Harmelin, A., Eberl, G., Itzkovitz, S., Tanay, A., Di Santo, J. P., Elinav, E., Amit, I. The spectrum and regulatory landscape of intestinal innate lymphoid cells are shaped by the microbiome., *Cell*, **166**, 1231-1246.e13, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.043>
- [173] Zhang, D., Frenette, P.S. Cross talk between neutrophils and the microbiota., *Blood*, **133**, 2168–2177, (2019) <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844555>
- [174] Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., Weiser, J.N. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* **16**, 228, (2010) <https://doi.org/10.1038/nm.2087>
- [175] Abraham, S.N., St. John, A.L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens., *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 440–452, (2010) <https://doi.org/10.1038/nri2782>.
- [176] Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 631–659, (2013) <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
- [177] Qiu, Y., Jiang, Z., Hu, S., Wang, L., Ma, X., Yang, X. Lactobacillus plantarum enhanced IL-22 production in natural killer (NK) cells that protect the integrity

- of intestinal epithelial cell barrier damaged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2409, (2017) <https://doi.org/10.3390/ijms18112409>
- [178] Lang, P.A., Lang, K.S., Xu, H.C., Grusdat, M., Parish, I.A., Recher, M., Elford, A.R., Dhanji, S., Shaabani, N., Tran, C.W., Dissanayake, D., Rahbar, R., Ghazarian, M., Brüstle, A., Fine, J., Chen, P., Weaver, C.T., Klose, C., Diefenbach, A., Häussinger, D., Carlyle, J.R., Kaech, S.M., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 1210–1215, (2012) <https://doi.org/10.1073/pnas.1118834109>
- [179] Qin, Y., Bao, X., Zheng, M. CD8+ T-cell immunity orchestrated by iNKT cells., *Front. Immunol.*, **13**, 1109347, (2023) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1109347>
- [180] Mu, Q., Edwards, M.R., Swartwout, B.K., Cabana Puig, X., Mao, J., Zhu, J., Grieco, J., Cecere, T.E., Prakash, M., Reilly, C.M., Puglisi, C., Bachali, P., Grammer, A.C., Lipsky, P.E., Luo, X.M., Gut microbiota and bacterial DNA suppress autoimmunity by stimulating regulatory B cells in a murine model of lupus. *Front. Immunol.*, **11**, 593353, (2020) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.593353>
- [181] van der Woude, D.; van der Helm-van, A.H.M. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **32**, 174–187, (2018) <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.005>
- [182] Malmström, V., Catrina, A. & Klareskog, L. La inmunopatogénesis de la artritis reumatoide seropositiva: del desencadenamiento al objetivo. *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 60–75, (2017) <https://doi.org/10.1038/nri.2016.124>
- [183] Jeffery, R.C. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Medicine*, **42**, 231–236, (2014) <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.02.011>.
- [184] Basile, M. S., Ciurleo, R., Bramanti, A., Petralia, M. C., Fagone, P., Nicoletti, F., & Cavalli, E. Cognitive decline in rheumatoid arthritis: insight into the molecular pathogenetic mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1185, (2021) <https://doi.org/10.3390/ijms22031185>
- [185] Mueller, A.L., Payandeh, Z., Mohammadkhani, N., Mubarak, S.M.H., Zakeri, A., Alagheband Bahrami, A., Brockmueller, A., Shakibaei, M. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells.*, **10**, 3017, (2021) doi: 10.3390/cells10113017.
- [186] Dessen, A., Lawrence, C.M., Cupo, S., Zaller, D.M., Wiley, D.C. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, **7**, 473–481, (1997) [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80369-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80369-6)

- [187] van Drongelen, V., Ali, W.H., Holoshitz, J. Uncovering a shared epitope-activated protein citrullination pathway. *J. Immunol.*, **205**, 579–586, (2020) <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901108>
- [188] Mondal, S., Thompson, P.R. Protein Arginine Deiminases (PADs): biochemistry and chemical biology of protein citrullination. *Accounts of chemical research*. **52**, 818–832, (2019) doi:10.1021/acs.accounts.9b00024.
- [189] Yu, K. & Proost, P. Insights into peptidylarginine deiminase expression and citrullination pathways. *Trends Cell Biol.*, **32**, 746–761, (2022) <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.01.014>
- [190] Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.*, **5**, 178ra40, (2013) DOI:10.1126/scitranslmed.3005580
- [191] Rebernick, R., Fahmy, L., Glover, C., Bawadekar, M., Shim, D., Holmes, C.L., Rademacher, N., Potluri, H., Bartels, C.M., & Shelef, M.A. DNA area and NETosis analysis (DANA): A high-throughput method to quantify neutrophil extracellular traps in fluorescent microscope images. *Biol. Proced. Online*, **20**, 7, (2018) <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0072-y>
- [192] Shelef, M.A., Sokolove, J., Lahey, L.J., Wagner, C.A., Sackmann, E.K., Warner, T.F., Wang, Y., Beebe, D.J., Robinson, W.H., Huttenlocher, A. Peptidylarginine deiminase 4 contributes to tumor necrosis factor a-induced inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, **66**, 1482–1491, (2014) <https://doi.org/10.1002/art.38393>
- [193] Holmes, C.L., Shim, D., Kernien, J., Johnson, C.J., Nett, J.E., Shelef, M.A. Insight into Neutrophil Extracellular Traps through Systematic Evaluation of Citrullination and Peptidylarginine Deiminases. *J. Immunol. Res.*, **2019**, 2160192, (2019) <https://doi.org/10.1155/2019/2160192>
- [194] Bashar, S.J., Holmes, C.L., Shelef, M.A. Macrophage extracellular traps require peptidylarginine deiminase 2 and 4 and are a source of citrullinated antigens bound by rheumatoid arthritis autoantibodies. *Front. Immunol.* **15**, 1167362, (2024) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1167362>
- [195] Cordova, K.N., Willis, V.C., Haskins K, Holers VM. A citrullinated fibrinogen-specific T cell line enhances autoimmune arthritis in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* **190**, 1457-65, 2013 doi: 10.4049/jimmunol.1201517
- [196] Ingegnoli, F., Castelli, R., Gualtierotti, R. Rheumatoid factors: clinical applications. *Disease markers*. **35**, 727– 734, (2013) <https://doi: 10.1155 / 2013/726598>
- [197] Xie, S., Li, S., Chen, B., Zhu, Q., Xu, L., Li, F. Serum Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Rheumatoid Factor Increase the Risk of Rheumatoid Arthritis-Related Interstitial Lung Disease: A Meta-Analysis. *Clin.*

Rheumatol. **40**, 4533–4543, (2021) <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05808-2>

- [198] Nielen, M.M.J., van Schaardenburg, D., Reesink, H.W., van de Stadt, R.J., van der Horst- Bruinsma, I.E., de Koning, M.H.M.T., Habibuw, M.R., Vandenbroucke, J.P., Dijkmans, B.A.C. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.*, **50**, 380–386, (2004) <https://doi.org/10.1002/art.20018>
- [199] Alam, J., Jantan, I., Bukhari, S.N.A. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.*, **92**, 615–633, (2017) <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.055>
- [200] Smolen, J.S.; Landewé, R.B.M.; Bijlsma, J.W.J.; Burmester, G.R.; Katerina Chatzidionysiou, Dougados, M.; Nam, J., Ramiro, S., Voshaar, M., van Vollenhoven, R., Aletaha, D., Aringer, M., Boers, M., Buckley, C.D., Buttgerit, F., Bykerk, V., Cardiel, M., Combe, B., Cutolo, M., van Eijk-Hustings, Y., Emery, P., Finckh, A., Gabay, C., Gomez-Reino, J., Gossec, L., Gottenberg, J-E., Hazes, J.M.W. Huizinga, T., Jani, M., Karateev, D., Kouloumas, M., Kvien, T., Li, Z., Mariette, X., McInnes, I., Mysler, E., Nash, P., Pavelka, K., Poór, G., Richez, C., van Riel, P., Rubbert-Roth, A., Saag, K., da Silva, J., Stamm, T., Takeuchi, T., Westhovens, R., de Wit, M., van der Heijde, D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, S685–S699, (2017) <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210715>
- [201] Picchianti-Diamanti, A., Rosado, M. & D’Amelio, R. Infectious agents and inflammation: The role of microbiota in autoimmune arthritis. *Front. Microbiol.*, **8**, 2696, (2018) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02696>
- [202] Jubair, W.K., Hendrickson, J.D., Severs, E.L., Schulz, H.M., Adhikari, S., Ir. D., Pagan, J.D., Anthony, R.M., Robertson, C.E., Frank, D.N., Banda, N.K., Kuhn, K.A. Modulation of inflammatory arthritis in mice by gut microbiota through mucosal inflammation and autoantibody generation. *Arthritis Rheumatol*, **70**, 1220–33, (2018) doi:10.1002/art.40490
- [203] Maeda, Y., Kurakawa, T., Umemoto, E., Motooka, D., Ito, Y., Gotoh, K., Hirota, K., Matsushita, M., Furuta, Y., Narazaki, M., Sakaguchi, N., Kayama, H., Nakamura, S., Iida, T., Saeki, Y., Kumanogoh, A., Sakaguchi, S., Takeda, K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol*, **68**, 2646– 61, (2016) doi:10.1002/art.39783
- [204] Pianta, A., Arvikar, S.L., Strle, K., Drouin, E.E., Wang, Q., Costello, C.E., Steere, A.C. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *J Clin Invest.*, **127**, 2946–56, (2017) doi:10.1172/JCI93450

- [205] Brandl, C., Bucci, L., Schett, G., Zaiss, M.M. Crossing the barriers: Revisiting the gut feeling in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, **51**, 798–810, (2021) <https://doi.org/10.1002/eji.202048876>
- [206] Oliveira, S.R., de Arruda, J.A.A., Corrêa, J.D., Carvalho, V.F., Medeiros, J.D., Schneider, A.H., Machado, C.C., Duffles, L.F., Fernandes, G.R., Calderaro, D.C., Júnior, M.T., Abreu, L.G., Fukada, S.Y., Oliveira, R.D.R., Louzada-Júnior, P., Cunha, F.Q., Silva, T.A. Methotrexate and Non-Surgical Periodontal Treatment Change the Oral–Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Cohort Study. *Microorganisms*, **12**, 68, (2024) <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010068>
- [207] Maeda, Y. & Takeda, K. Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis. *Exp. Mol. Med.*, **51**, 1–6, (2019) <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0283-6>.
- [208] Bereta, G., Goulas, T., Madej, M., Bielecka, E., Solà, M., Potempa, J., & Gomis-Rüth, F.X. Structure, function, and inhibition of a genomic/clinical variant of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. *Protein Sci.*, **28**, 478-486. (2019) <https://doi.org/10.1002/pro.3571>
- [209] Goulas, T., Mizgalska, D., Garcia-Ferrer, I., Kantyka, T., Guevara, T., Szmigielski, B., Sroka, A., Millán, C., Usón, I., Veillard, F., Potempa, B., Mydel, P., Solà, M., Potempa, J. & Gomis-Rüth, F. X. Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. *Sci. Rep.*, **5**, 11969, (2015) <https://doi.org/10.1038/srep11969>
- [210] Huang, J. B., Chen, Z. R., Yang, S. L., & Hong, F. F. Nitric oxide synthases in rheumatoid arthritis. *Molecules*, **28**, 4414, (2023) <https://doi.org/10.3390/molecules28114414>
- [211] Yu, N. N., & Park, G. Nitric Oxide in Fungi: Production and Function. *J. Fungi*, **10**, 155, (2024) <https://doi.org/10.3390/jof10020155>
- [212] Chen, J., Wright, K., Davis, J.M., Jeraldo, P., Marietta, E.V., Murray, J., Nelson, H., Matteson, E.L., Taneja, V. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.*, **8**, 14, (2016) <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0299-7>
- [213] König, M.F., Abusleme, L., Reinholdt, J., Palmer, R.J., Teles, R.P., Sampson, K., Rosen, A., Nigrovic, P.A., Sokolove, J., Giles, J.T., Moutsopoulos, N.M. & Andrade, F. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.*, **8**, 369ra176, (2016) doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921
- [214] Stobernack, T., Glasner, C., Junker, S., Gabarrini, G., De Smit, M., Van Winkelhoff, A.J., De Jong, A., Otto, A., Becher, D., Van Dijl, J.M. Extracellular Proteome and Citrullinome of the Oral Pathogen Porphyromonas

- gingivalis. *J. Proteome Res.*, **15**, 4532–4543, (2016) <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00634>
- [215] McGraw, W. T., Potempa, J., Farley, D., & Travis, J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect. Immun.*, **67**, 3248–3256, (1999) <https://doi.org/10.1128/iai.67.7.3248-3256.1999>
- [216] Toyofuku, M., Nomura, N., Eberl, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 13–24, (2019) <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- [217] Doward, D.W. & Garon, C.F. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of Gram-negative but not Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1960–1962, (1990) <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1960-1962.1990>
- [218] Smith, B. A., Gupta, N., Denny, K., & Culver, G. M. Characterization of 16S rRNA processing with pre-30S subunit assembly intermediates from *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, **430**, 1745–1759, (2018) <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.009>
- [219] Guo, Q., Bedford, M. T., & Fast, W. Discovery of peptidylarginine deiminase-4 substrates by protein array: antagonistic citrullination and methylation of human ribosomal protein S2. *Mol. BioSyst.*, **7**, 2286–2295, (2011) <https://doi.org/10.1039/C1MB05089C>
- [220] Perna, N. T., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. & Blattner, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature*, **409**, 529–533, (2001) <https://doi.org/10.1038/35054089>
- [221] Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Bouguéneq, C.L. Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Saint Ruf, C., Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P.C. & Denamur, E. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.*, **5**, e1000344, (2009) <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- [222] Claushuis, T. A., van der Donk, L. E., Luitse, A. L., van Veen, H. A., van der Wel, N. N., van Vught, L. A., Roelofs, J.J., de Boer, O.J., Lankelma, J.M., Boon, L., de Vos, A.F., van 't Veer, C. & van der Poll, T. Role of peptidylarginine deiminase 4 in neutrophil extracellular trap formation and host defense during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia-derived

- sepsis. *J. Immunol.*, **201**, 1241-1252, (2018)
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800314>
- [223] Schimmel, P. Development of tRNA synthetases and connection to genetic code and disease. *Protein Sci.*, **17**, 1643-1652, (2008)
<https://doi.org/10.1110/ps.037242.108>
- [224] Pimentel, T. C., Brandão, L. R., de Oliveira, M. P., da Costa, W. K. A., & Magnani, M. Health benefits and technological effects of Lacticaseibacillus casei-01: An overview of the scientific literature. *Trends in Food Science & Technology*, **114**, 722-737, (2021) <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.030>
- [225] Vossenaar, E., Nijenhuis, S., van Helsen, M. M., van der Heijden, A., Van den Berg, W. B., van Venrooij, W. J., & Joosten, L. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, **5**, 1-2, (2003) <https://doi.org/10.1186/ar660>
- [226] Li, S., Yu, Y., Yue, Y., Liao, H., Xie, W., Thai, J., Mikuls, T.R., Thiele, G.M., Duryee, M.J., Sayles, H., Payne, J.B., Klassen, L.W., O'Dell, J.R., Zhang, Z., Su, K. Autoantibodies from Single Circulating Plasmablasts React With Citrullinated Antigens and Porphyromonas gingivalis in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, **68**, 614–626, (2016) <https://doi.org/10.1002/art.39455>
- [227] Courbon, G.; Rinaudo-Gaujous, M.; Blasco-Baque, V.; Auger, I.; Caire, R.; Mijola, L.; Vico, L.; Paul, S.; Marotte, H. Porphyromonas gingivalis experimentally induces periodontitis and an anti-CCP2-associated arthritis in the rat. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 594–599, (2019)
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213697>
- [228] Cantaert, T.; Teitsma, C.; Tak, P.P.; Baeten, D. Presence and Role of Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Experimental Arthritis Models. *Arthritis Rheum.*, **65**, 939–948, (2013) <https://doi.org/10.1002/art.37839>
- [229] György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A., & Buzás, E. I. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 1662-1677, (2006) <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.008>
- [230] Potempa, J., Sroka, A., Imamura, T., & Travis, J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of Porphyromonas gingivalis: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **4**, 397-407, (2003)
<https://doi.org/10.2174/1389203033487036>
- [231] Jeong, S.H., Nam, Y., Jung, H., Kim, J., Rim, Y.A., Park, N., Lee, K., Choi, S., Jang, Y., Kim, Y., Moon, J-H., Jung, S.M., Park, S-H. & Ju, J.H. Interrupting oral infection of Porphyromonas gingivalis with anti-fima antibody attenuates bacterial dissemination to the arthritic joint and improves experimental arthritis. *Exp. Mol. Med.*, **50**, e460-11, (2018)
<https://doi.org/10.1038/emm.2017.301>

- [232] Van Der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Tchetverikov, I., Schrijver, I.A., Schouls, L.M., Hazenberg, M.P., Breedveld, F.C., Tak, P.P. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.*, **43**, 593–598, (2000) [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<593::AID-ANR16>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<593::AID-ANR16>3.0.CO;2-1)
- [233] Bennike, T.B., Ellingsen, T., Glerup, H., Bonderup, O.K., Carlsen, T.G., Meyer, M.K., Bøgsted, M., Christiansen, G., Birkelund, S., Andersen, V., Stensballe, A. Proteome analysis of rheumatoid arthritis gut mucosa. *J. Proteome Res.*, **16**, 346–354, (2017) <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00598>
- [234] Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schäler, F., Lucas, S., Azizov, V., Dürholz, K., Steffen, F., Omata, Y., Rings, A., Bertog, M., Rizzo, A., Iljazovic, A., Basic, M., Kleyer, A., Culemann, S., Krönke, G., Luo, Y., Überla, K., Gaipl, U.S., Frey, B., Strowig, T., Sarter, K., Bischoff, S.C., Wirtz, S., Cañete, J.D., Ciccia, F., Schett, G. & Zaiss, M. M. Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nat. Commun.*, **11**, 1995, (2020) <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>

CAPÍTULO 14. ANEXOS

1. Tabla 14.1. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en píxeles (px).
2. Tabla 14.2. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en unidades (U).
3. Tabla 14.3. Reactividad de anticuerpos anti-microbianos de los grupos de estudio.
4. Tabla 14.4. Concentraciones de AbsZON conocidas para curva de calibración.
5. Tabla 14.5. Concentraciones de AbsZON en los casos (AR).
6. Tabla 14.6. Concentraciones de AbsZON en los controles.
7. Tabla 14.7. Valor de corte calculado en curva ROC.
8. Figura 14.1. Curva ROC.
9. Tabla 14.8. Área bajo la curva ROC.
10. Carta de consentimiento informado.
11. Constancia de participación en el III Congreso Nacional de Biología Integrativa. Noviembre de 2024.
12. Publicación de Artículo. Mayo de 2024.
13. Constancias de participación en el evento de vinculación e intercambio académico con Universidad Politécnica de Zacatecas. Abril de 2024, Guadalupe, Zac.
14. Constancias de participación en la Jornada Estatal de Ciencia y Tecnología. Noviembre de 2023, Guadalupe, Zac.
15. Constancia de participación en la escuela internacional de verano. Agosto de 2023, Guadalupe, Zac.
16. Constancia de participación en el XXV Congreso Nacional de Inmunología. Junio de 2023, Querétaro, Qro.
17. Memoria en extenso del trabajo presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología. Junio de 2023, Querétaro, Qro.
18. Constancia de participación en el 4to Simposium Estatal, 2do Nacional de enfermedades causadas por microorganismos. Abril de 2023, Zacatecas, Zac.
19. Constancias de participación en el evento de vinculación e intercambio académico con Universidad Politécnica de Zacatecas. Marzo de 2023, Guadalupe, Zac.
20. Constancia de participación en el LI Congreso Mexicano de Reumatología. Febrero de 2023, Mérida Yucatán.
21. Memoria en extenso del trabajo presentado en el LI Congreso Mexicano de Reumatología. Febrero de 2023, Mérida Yucatán.
22. Constancias de participación en la 4ta Jornada Estatal de Ciencia y Tecnología. Noviembre de 2022, Guadalupe, Zac.
23. Constancia de participación en el II Congreso Nacional de Biología Integrativa. Octubre de 2022, Zacatecas, Zac.

24. Constancias de participación en el evento de vinculación e intercambio académico con Universidad Politécnica de Zacatecas. Julio de 2022, Guadalupe, Zac.
25. Constancias de participación en la Jornada Estatal de Ciencia y Tecnología. Noviembre de 2021, Guadalupe, Zac.

Tabla 14.1. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en pixeles (px).

n	Especie	Hs-PAD2 (px)	Hs-PAD4 (px)	AgCIT (px)	HSP70 (px)
Proteobacteria					
1	<i>P. mirabilis</i>	7938810	0	2958080	1974462
2	<i>P. vulgaris</i>	0	449652	1357600	1612632
3	<i>E. coli</i>	10782379	14873901	8339840	1727502
4	<i>K. pneumoniae</i>	295519	0	2537120	1547490
5	<i>K. oxytoca</i>	836533	207060	1159760	2042502
6	<i>C. freundii</i>	120287	1938426	7157400	1082634
7	<i>M. morgani</i>	9527584	9880164	4666280	1232196
8	<i>P. aeruginosa</i>	1006363	234864	2713160	1532538
9	<i>A. baumannii</i>	0	10617894	1961960	1577814
Firmicutes					
10	<i>Lactobacillus sp</i>	0	0	0	944874
11	<i>E. faecalis</i>	0	0	0	1251768
12	<i>S. epidermidis</i>	13168242	9594246	5618040	1109304
13	<i>S. aureus</i>	9910562	6748805	4653440	1220058
Ascomycota					
14	<i>C. albicans</i>	3178324	857228	3102880	1407756
15	<i>C. glabrata</i>	2721129	5444636	2785920	874440
16	<i>C. tropicalis</i>	951556	0	662840	967386
17	<i>S. cerevisiae</i>	4628404	4046659	1450760	845208

Tabla 14.2. Valores de la expresión de Hs-PAD2/4, AgCIT y HSP70 en unidades (U), después de la normalización con la proteína constitutiva.

n	Especie	Hs-PAD2 (U)	Hs-PAD4 (U)	AgCIT (U)	HSP70 (U)
Proteobacteria					
1	<i>P. mirabilis</i>	3.02	-1	0.5	1
2	<i>P. vulgaris</i>	-1	-0.72	-0.16	1
3	<i>E. coli</i>	5.24	7.61	3.83	1
4	<i>K. pneumoniae</i>	-0.81	-1	0.64	1
5	<i>K. oxytoca</i>	-0.59	-0.9	-0.43	1
6	<i>C. freundii</i>	-0.89	0.79	5.61	1
7	<i>M. morgani</i>	6.73	7.02	2.79	1
8	<i>P. aeruginosa</i>	-0.34	-0.85	0.77	1
9	<i>A. baumannii</i>	-1	5.73	0.24	1
Firmicutes					
10	<i>Lactobacillus sp</i>	-1	-1	-1	1
11	<i>E. faecalis</i>	-1	-1	-1	1
12	<i>S. epidermidis</i>	10.87	7.65	4.06	1
13	<i>S. aureus</i>	7.12	4.53	2.81	1
Ascomycota					
14	<i>C. albicans</i>	1.26	-0.39	1.2	1
15	<i>C. glabrata</i>	2.11	5.23	2.19	1
16	<i>C. tropicalis</i>	-0.02	-1	-0.31	1
17	<i>S. cerevisiae</i>	4.48	3.79	0.72	1

Tabla. 14.3. Reactividad de Abs anti-microbianos de los grupos de estudio.

N	Anticuerpos anti-microbianos (Intensidad en pixeles)			
	IgG		IgA	
	AR	Control	AR	Control
1	12 444 575	20 144 550	2 587 225	1 110 072
2	13 702 992	14 602 704	1 765 536	7 899 168
3	34 596 107	5 626 992	12 311 588	1 318 416
4	58 823 472	2 133 126	3 708 465	2 514 586
5	58 600 164	4 648 896	19 235 925	2 545 647
6	14 763 828	5 626 992	2 790 061	1 318 416
7	29 399 472	5 626 992	1 318 416	3 156 996
8	17 057 996	13 128 720	8 075 438	9 591 888
9	52 316 784	7 901 760	2 564 016	2 589 634
10	13 702 992	5 626 992	1 765 536	1 318 416
\bar{x}	30 540 838	8 506 772	5 612 220	3 336 323
DS	19 449 006	5 607 592	5 912 472	2 962 990

Tabla. 14.4. Concentraciones de AbsZON conocidas para curva de calibración.

	AbsZON (ng/mL)	ABSORBANCIA	ABS INVERSA
Estándar A	0	1.259	0.794281176
Estándar B	50	1.203	0.831255195
Estándar C	100	0.968	1.033057851
Estándar D	250	0.521	1.919385797
Estándar E	500	0.21	4.761904762
Estándar F	1000	0.119	8.403361345

Tabla. 14.5. Concentraciones de AbsZON en los casos (AR).

n	ABSORBANCIA	ABS INVERSA	AbsZON (ng/mL)
1	0.768	1.302083333	109.97
2	0.522	1.915708812	186.68
3	0.997	1.003009027	72.59
4	0.86	1.162790698	92.56
5	1.079	0.926784059	63.06
6	0.922	1.084598698	82.79
7	0.841	1.189060642	95.85
8	1.004	0.996015936	71.71
9	0.873	1.145475372	90.4
10	0.862	1.160092807	92.22

Tabla. 14.6. Concentraciones de AbsZON en los controles.

n	ABSORBANCIA	ABS INVERSA	AbsZON (ng/mL)
1	1.086	0.920810313	62.31
2	1.113	0.898472597	59.52
3	1.146	0.872600349	56.29
4	1.046	0.956022945	66.72
5	0.965	1.03626943	76.75
6	1.123	0.89047195	58.52
7	1.111	0.900090009	59.72
8	1.009	0.991080278	71.1
9	1.159	0.86281277	55.06
10	1.162	0.860585198	54.79

Tabla. 14.7. Valor de corte calculado en curva ROC.

Valor de corte ng/mL	% Sensibilidad	% Especificidad
> 54.93	100	10
> 55.68	100	20
> 57.41	100	30
> 59.02	100	40
> 59.62	100	50
> 61.02	100	60
> 62.69	100	70
> 64.89	90	70
> 68.91	90	80
> 71.41	90	90
> 72.15	80	90
> 74.67	70	90
> 79.77	70	100
> 86.60	60	100
> 91.31	50	100
> 92.39	40	100
> 94.21	30	100
> 102.9	20	100
> 148.3	10	100

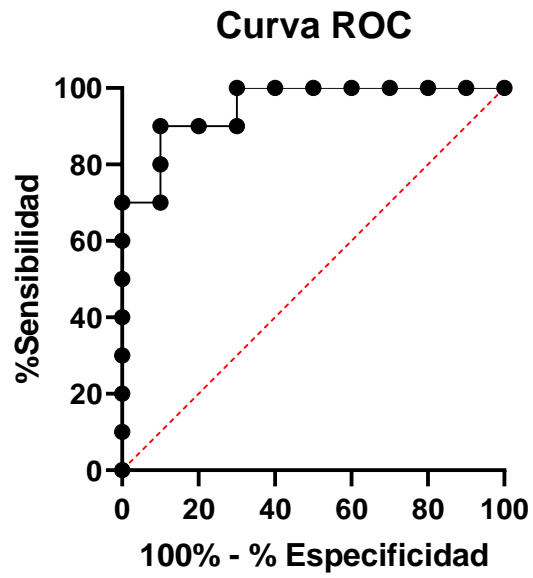


Figura 14.1. Curva ROC. Cálculo del valor de corte en los niveles de AbsZON de casos (AR) y controles.

Tabla. 14.8. Área bajo la curva ROC.

Área bajo la curva ROC	
Área	0.95
Error std	0.04478
IC 95%	0.8622 to 1.000
Valor de p	0.0007