



Formación médica continuada

Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide[☆]

Elizabeth Olivares Martínez, Diego F. Hernández Ramírez, Carlos A. Núñez-Álvarez* y Javier Cabiedes⁺

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de julio de 2009

Aceptado el 24 de septiembre de 2009

On-line el 31 diciembre 2009

Palabras clave:

Citrulinación

Artritis reumatoide

Anticuerpos antiproteínas citrulinadas

Keywords:

Citrullination

Rheumatoid arthritis

Anti-citrullinated protein antibodies

R E S U M E N

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune de etiología multifactorial caracterizada por inflamación de las articulaciones y presencia de múltiples autoanticuerpos. Recientemente, el estudio de los anticuerpos antiproteínas citrulinadas (APS) ha adquirido gran interés debido a su alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico, además de que se ha demostrado que es predictor de severidad en pacientes con artritis reumatoide; lo cual sugiere un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis

A B S T R A C T

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease of multifactorial etiology characterized by inflammation of the joints and presence of autoantibodies directed against multiple autoantigens. Recently the study of the anti-citrullinated protein antibodies (ACP) has acquired great interest due to its high specificity and sensitivity for diagnosis, in addition to which it has shown to be a predictor of severity in patients with rheumatoid arthritis, suggesting an important participation in the pathogenesis of the disease.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune generalizada de etiología multifactorial y de distribución mundial. Su prevalencia es de alrededor del 1,0% en la población adulta y es más frecuente en mujeres que en varones (de 2 a 3 mujeres por cada varón afectado). La mayor incidencia en mujeres ocurre entre los 40 y 60 años de edad¹.

Aunque puede afectar a diversos órganos, la AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, de las vainas tendinosas y de las bursas sinoviales de deslizamiento. En el tejido sinovial inflamado, se presentan características de destrucción local que invaden y dañan a las estructuras de la articulación, resultando en la pérdida de la fun-

ción, lo que ocasiona discapacidad en los pacientes con AR². En individuos afectados existe predisposición genética y los alelos del HLA-DR1 y DR4 son los más asociados a la patogénesis de la enfermedad³.

El diagnóstico de la AR se fundamenta, principalmente, en las manifestaciones clínicas basadas en los criterios de clasificación de 1978 del Colegio Americano de Reumatología (CAR). Sin embargo, hay que destacar que entre los criterios de clasificación se encuentra la presencia del factor reumatoide (FR)⁴. Lo que se define como FR son autoanticuerpos que reaccionan contra la región Fc de las inmunoglobulinas de isotipo IgG. El FR es un biomarcador no específico para AR, debido a que se incrementa como consecuencia general de la activación de la respuesta inmune en el contexto de la formación de complejos inmunes⁵. Además, puede presentarse a títulos altos en infecciones crónicas y en otras enfermedades autoinmunes como: lupus eritematoso generalizado (LEG), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) y síndrome de Sjögren primario (SSP). También se puede detectar en población adulta y en sujetos sanos⁶⁻⁸.

En años recientes, el estudio de la reactividad de los anticuerpos antiproteínas citrulinadas ha adquirido gran interés. Los

[☆] Nota: Sección acreditada por el SEAFORMEC con 1,7 créditos. Consultar preguntas de cada artículo en: URL: <http://www.reumatologiainclinica.org>.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: nuac80df@yahoo.com.mx (C.A. Núñez-Álvarez).

⁺ In memoriam a nuestro maestro y amigo.

anticuerpos que más se han asociado con la AR son: los anticuerpos antifactor perinuclear (AFP) y antiqueratina (AKA), ambos dirigidos contra filagrina citrulinada⁹; anticuerpos anti-Sa, los cuales reconocen vimentina citrulinada¹⁰ y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC)⁶. Estos últimos tienen una sensibilidad mayor del 80% y especificidad del 98% en pacientes con AR¹¹. Además de su alta sensibilidad y especificidad, se presentan en etapas tempranas de la enfermedad.

Peptidil arginina deiminasa y citrulinación en AR

Las modificaciones postraduccionales (MPT) son cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas. Una de las MPT es la citrulinación (conversión del residuo arginina a citrulina), la cual es catalizada por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD), de la que se han identificado 5 isoformas de la PAD con expresión diferencial en tejidos y órganos.

Las isoformas de la PAD están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. PAD1 se expresa predominantemente en la epidermis y útero; PAD2 es el miembro más ubicuo de la familia y se expresa en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales, útero, etc.; PAD3 se expresa en folículos; PAD4 se expresa en neutrófilos y eosinófilos, en tanto que la PAD6 ha sido detectada en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica.

El estudio de la citrulinación de proteínas ha adquirido gran interés debido a su participación en diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos. Dentro de los procesos fisiológicos, se incluye la diferenciación terminal de células epiteliales, la regulación en la expresión de genes y la apoptosis; en tanto que en los procesos patológicos, las proteínas citrulinadas se han relacionado con la progresión de la enfermedad en AR, esclerosis múltiple y Alzheimer, entre otros.

La conversión de arginina en citrulina es capaz de activar la respuesta inmune. Dicha conversión da como resultado un cambio en la carga del aminoácido. A nivel proteico, la reacción provoca una reducción en la masa molecular de aproximadamente 1,0 Da, por cada arginina modificada. La carga positiva se pierde, por lo que el punto isoeléctrico (pI) también se ve modificado y las interacciones con otras proteínas también pueden verse afectadas^{12,13}.

En autoinmunidad, la expresión de PAD4 se ha asociado con el desarrollo de manifestaciones clínicas de AR¹⁴⁻¹⁷. Recientemente, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas, así como la expresión de PAD4, preceden a la aparición de manifestaciones clínicas en AR¹⁴. Por otro lado, también se han detectado PAD2 y proteínas citrulinadas en el líquido sinovial de pacientes con AR y espondiloartritis (EA)¹⁸; lo que sugiere que la citrulinación es un proceso asociado a la inflamación, pero la generación de anticuerpos patogénicos que reconocen proteínas citrulinadas es un proceso específico de la AR¹⁸.

Otro aspecto importante en relación a la expresión de PAD4 es la asociación de ciertos polimorfismos con el desarrollo de AR. En el 2003, Suzuki et al estudiaron en población japonesa polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y observaron asociación entre haplotipos funcionales del gen *padi4* con AR. Identificaron 4 haplotipos de *padi4*, de los cuales 1 y 2 tuvieron una frecuencia del 82%; en tanto que 3 y 4, del 18%. El 32% de los pacientes con AR presentaron el haplotipo 2 en comparación con el 25% de sujetos sanos, y la diferencia era significativa ($p=0,000008$)¹⁹. La razón por la cual el haplotipo 2 de la *padi4* puede incrementar la susceptibilidad para AR no se conoce. Sin embargo, se sabe que el tiempo de vida media del ARNm del haplotipo 2 es de 11,6 min y el del haplotipo 1 es de solo 2,1 min; por lo que la susceptibilidad puede ser explicada por la alta posibilidad de traducción de la PAD, resultando en una mayor cantidad de enzima y consecuentemente en un aumento en la citrulinación de proteínas (fibrinógeno o vimentina). Esto podría

estimular tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, permitiendo de esta manera el desarrollo de inflamación crónica¹⁹. El estudio de Suzuki ha generado un gran interés. Sin embargo, el fenómeno no fue corroborado en poblaciones con AR de Francia, Reino Unido y España²⁰⁻²². Solo un estudio realizado en población coreana confirmó dicha asociación²³. Lo anterior sugiere la importante participación del polimorfismo en población asiática, pero no en población caucásica europea.

Proteínas citrulinadas en AR

En 1964, Nijenhuis y Mandema describieron por primera vez los anticuerpos AFP en pacientes con AR²⁴. En 1979, Young demostró que los sueros de pacientes con AR reaccionaban contra el epitelio de esófago de rata y definió a estos anticuerpos, como anticuerpos AKA²⁵. Ambos autoanticuerpos, detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, mostraron alta especificidad en AR (94% aproximadamente). Sin embargo, debido a la sensibilidad limitada (40-55%), a las dificultades técnicas para su determinación y a la falta de estandarización de las técnicas utilizadas, el estudio de los autoanticuerpos AFP y AKA fue exclusivo de trabajos de investigación y laboratorios de inmunología especializados.

En 1995, Sebbag et al mostraron que tanto los anticuerpos AKA como los AFP reconocen moléculas relacionadas con la filagrina y la profilagrina²⁶. Posteriormente, observaron que los sueros de pacientes con AR presentaban una mayor reactividad contra profilagrina in vitro²⁶. Sin embargo, en estudios posteriores en los que se utilizó filagrina recombinante o fragmentos de péptidos sintéticos de profilagrina, los sueros de pacientes con AR no mostraron reactividad²⁷. Lo anterior sugirió que la inmunogenicidad de la filagrina y la profilagrina estaba relacionada con MPT. En el mismo trabajo, Girbal-Neuhaser demostró que el antígeno reconocido por los anticuerpos AKA y AFP era la profilagrina citrulinada²⁷. Sin embargo, un estudio detallado reveló que no hay expresión in vivo de profilagrina en tejidos sinoviales²⁸. Esto excluyó la posibilidad de que el antígeno reconocido in vivo por los AKA y AFP fuera la profilagrina, ya que la inflamación solo ocurre en las articulaciones y no en la epidermis, donde la profilagrina se expresa en mayor abundancia²⁸. Trabajos posteriores mostraron que tanto la cadena α como la β de la fibrina citrulinada son los antígenos reconocidos por los anticuerpos APC y que están presentes en pacientes con AR¹¹.

Debido a la importancia de la detección de los APC, existen diversos estudios relacionados con la identificación de estos o de los antígenos citrulinados predominantes. Se han descrito distintas proteínas citrulinadas con alta especificidad para AR, entre las que se encuentran las colágenas tipo I y II (CI y CII)^{29,30}, fibrinógeno²⁸ y vimentina^{10,31}. Matsuo et al analizaron el perfil proteómico del tejido sinovial de un paciente con AR y detectaron 51 proteínas citrulinadas, de las cuales 30 (58,8%) fueron antigénicas³². Trece de las 30 proteínas fueron identificadas como derivados del fibrinógeno, la asporina y la subunidad α de la proteína de unión a actina-F (CapZ α -1). Además, detectaron anticuerpos contra CapZ α -1 en 16 de los 30 sueros de pacientes con AR (53,3%), en 2 de los 28 de pacientes con osteoartritis (7,1%) y en 2 de los 31 de sujetos sanos (6,5%)³². Otro antígeno importante, reportado como blanco de los APC, es la enolasa- α citrulinada, la cual fue identificada mediante inmunohistoquímica en cortes de tejido sinovial de pacientes con AR. Kinloch et al en 2005 reportaron la presencia de anticuerpos contra la enolasa- α en 46% de los sueros de pacientes con AR³³.

Los datos publicados muestran la existencia de múltiples proteínas que son blanco de los APC, las cuales presentan diferentes sensibilidades y especificidades para el diagnóstico de AR. En un estudio realizado en nuestro laboratorio, identificamos epítopes de la enolasa- α que comparten homología con residuos que flanquean

a la citrulina en secuencias de la CII, fibrina y vimentina; lo cual podría explicar la similitud en la especificidad de los anticuerpos que reconocen estas proteínas y que están presentes en pacientes con AR³⁴.

Papel patogénico de la citrulinación en AR

Trabajos recientes en modelos de artritis inducida por CII, muestran la participación de la citrulinación en la respuesta autoinmune. Lundberg et al demostraron en el modelo de rata Lew.1AV que la citrulinación de la colágena es un potente mecanismo para incrementar la autoreactividad y que los anticuerpos APC presentan reactividad cruzada contra CII citrulinada y CII nativa. Mostraron, además, que la severidad de la artritis está correlacionada con la expresión de PAD4 en el infiltrado de células mononucleares y con la cantidad de CII citrulinada³⁵. En otro estudio, Hill et al mostraron que ratones transgénicos para la molécula del complejo principal de histocompatibilidad DRB1*0401, inmunizados con fibrinógeno citrulinado humano, desarrollaron artritis progresiva con presencia de APC^{36,37}.

Por otro lado, uno de los factores que se ha relacionado con el incremento del riesgo para desarrollar AR es fumar. Klareskog et al en 2006 observaron correlación entre la presencia del alelo HLA-DRB1*0401 con anticuerpos APC en individuos con AR fumadores. El riesgo relativo de desarrollar AR y la presencia de anticuerpos APC positivos es 20 veces mayor para los pacientes fumadores con el alelo HLA-DB1*0401 que para los no fumadores sin el alelo³⁸.

La asociación entre la citrulinación de proteínas en los pulmones de fumadores y el inicio de la respuesta inmune contra dichas proteínas en AR es un fenómeno que podría no ser exclusivo de fumadores³⁹. La exposición a otros contaminantes puede causar daño al tejido pulmonar, liberación de PAD, la cual aumenta la citrulinación de proteínas liberadas por el daño y en individuos genéticamente susceptibles incrementa el riesgo de desarrollar autoinmunidad⁴⁰.

Conclusiones

- La presencia de autoanticuerpos que reconocen proteínas citrulinadas son marcadores serológicos específicos de AR.
- Las isoformas PAD2 y PAD4 son las enzimas que se asocian con la generación de autoantígenos citrulinados en AR.
- Los autoantígenos citrulinados que muestran mayor especificidad para AR son: fibrinógeno, vimentina, CII y enolasa- α .
- La presencia de proteínas citrulinadas así como la predisposición genética son dos factores importantes que se asocian con el desarrollo de artritis.
- Existen otros factores como el consumo de tabaco que participan en el desarrollo de AR.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hochberg MC, Spector TD. Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: Update. *Epidem Rev.* 1990;12:247-52.
- Pascual GE. Manifestaciones clínicas articulares. En: Arán, editor. *Tratado de Reumatología*. España. 1998; p. 437-38.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum.* 1987;30:1205-13.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheum.* 1988;31:315-24.
- Nemazee D. Immune complex can trigger specific, T-cell dependent, autoanti-IgG antibody production in mice. *J Exp Med.* 1985;161:242-56.
- van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis & Rheum.* 2004;50:709-15.
- van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FH, van Booma-Frankfort C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide autoantibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1999;17:689-97.
- Zeng X, Ai M, Tian X, Gan X, Shi Y, Song Q. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2003;30:1451-5.
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1995;95:2672-9.
- Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:142-50.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43:155-63.
- van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: A small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:249-51.
- Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem.* 1996;271:30709-16.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheum.* 2004;50:380-6.
- Majka DS, Deane KD, Parrish LA, Lazar AA, Barón AE, Walker CW, et al. Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:801-7.
- Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioassays.* 2003;25:1106-18.
- Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuihara S, et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005;44:40-50.
- Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, et al. Synovial fluid is a site citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheum.* 2008;58:2287-95.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuihara S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003;34:395-402.
- Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:587-93.
- Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis & Rheum.* 2004;50:1117-21.
- Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Lamas JR, Fernández-Arquero M, Balsa A, et al. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatology.* 2005;44:1263-6.
- Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis & Rheum.* 2006;54:90-6.
- Nijenhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis.* 1964;23:302-5.
- Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J.* 1979;2:97-9.
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1995;95:2672-9.
- Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebag M, Vincent C, Senshu T, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol.* 1999;162:585-94.
- Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* 2001;166:4177-84.
- Cook AD, Gray R, Ramshaw J, Mackay I, Rowley M. Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R477-83.
- Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333:418-26.

31. Tilleman K, Steendam K, Cantaert T, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides. *Rheumatology*. 2008;47:597–604.
32. Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, et al. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R175.
33. Kinloch A, Tatzler V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, et al. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R1421–9.
34. Olivares-Martínez E. Identificación de los péptidos reconocidos por los anticuerpos anti-péptidos citrulinados presentes en los pacientes con artritis temprana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008.
35. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R458–67.
36. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting Edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*. 2003;171:538–41.
37. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrlri B, Jevnikar AM, et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med*. 2008;205:967–79.
38. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtson C, Grunewald J, et al. A new model for etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)- restricted immune reactions to antigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54:38–46.
39. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008;10:826–50.
40. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immune to Citrullinated Proteins in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol*. 2008;26:651–75.