

**Producción de una Peptidil arginina deiminasa de *Porphyromonas gingivalis* (PPAD) de
manera recombinante**

Daniela Castillo Ramírez

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC.- 8 JUNIO 2018**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Producción de una Peptidil arginina deiminasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (PPAD) de manera recombinante
Grupo de Investigación:	Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral)
Línea de investigación:	Microbiología Oral
Institución(es) participante(s):	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral)
Tipo de investigación:	Pregrado
Estudiantes/ residentes:	Daniela Castillo Ramírez
Asesor metodológico:	Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor temático:	Diana Marcela Castillo
Asesor estadístico:	Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
1.Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	9
4. Justificación	11
5. Objetivos	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivos específicos	12
6. Metodología del Proyecto	13
6.1. Tipo de estudio	
6.2.1 Diseño de primer para la fracción N-Terminal	13
6.2.2 PCR para fracción N-terminal	13
6.2.3 Clonación de fracción N-terminal de PPAD	14
6.2.4 Transformación en <i>E. coli</i> Top 10	14
6.2.5 Rastreo del inserto en las colonias después de la transformación	15
6.2.6 Extracción de plásmidos a partir de las colonias con inserto.	15
6.2.7 Cuantificación de plásmidos y confirmación del inserto	16
6.2.8 Digestión del plásmido pGEM con PPAD-NT	16
6.2.9 Clonación del producto en el plásmido de expresión pET	17
6.2.10 Transformación en <i>E. coli</i> BL21	18
6.2.11 Verificación de la dirección del inserto de PPAD-NT	18
6.2.12. Inducción de expresión de la proteínas PPAD-NT en <i>E. coli</i> BL21	18
7. Resultados	20
7.1 Secuencia de proteína y primers diseñados	20
7.2 Amplificación del fragmento PPAD-NT por PCR	20
7.3 Clonación del fragmento previamente amplificado en <i>E. coli</i> Top 10	21
7.4 Extracción de plásmidos con el inserto a partir de las colonias previamente confirmadas	22

8. Discusión	25
9. Conclusión	28
10. Referencias Bibliográficas.	29

RESUMEN

Producción de una Peptidil arginina deiminasa (PPAD) de manera recombinante de *Porphyromonas gingivalis*

Antecedentes: La enzima Peptidil arginina deiminasa producida por *P. gingivalis* (PPAD) induce la conversión de la arginina en citrulina en proteínas bacterianas y humanas; favoreciendo la producción de anticuerpos contra proteínas citrulinadas. Varios estudios han evaluado la relación entre anticuerpos anti-PPAD y un aumento en la actividad de la artritis reumatoide (AR), aún existe controversia en este aspecto. De ahí la importancia en evaluar la presencia de anti-PPAD en pacientes con AR siendo indispensable la PPAD recombinante como antígeno para evaluar anticuerpos en individuos con AR. **Objetivo:** Producir una PPAD-NT recombinante.

Materiales y Métodos: Se diseñaron primers para el fragmento N-terminal, basados en la secuencia de la PPAD almacenada en la base de datos del NCBI. Posteriormente el fragmento N-terminal fue amplificado por PCR y clonado en el plásmido pGEM-R-T para la propagación del inserto, la transformación se realizó en *Escherichia coli*. Top 10. El inserto se rastreó por PCR, los clones se propagaron y se realizó extracción. Se realizó la restricción del inserto con las enzimas *XbaI* y *NsiI* y se clonó de nuevo en el plásmido de expresión pET-CT, y se transformó en *E.coli* BL21. Se realizó el rastreo de clones y se confirmó direccionalidad del inserto por PCR. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína con IPTG 1mM evaluada por SDS-PAGE en sobrenadantes y pellets celulares a diferentes tiempos (2, 4, 6 y 18 horas) para confirmar la producción de la proteína.

Resultados: Se confirmó la producción de la PPAD-NT recombinante en los pellets celulares con un fragmento de aproximadamente 25kDa a las dos horas de inducción, no se encontró la proteína en los sobrenadantes, lo que indica que la proteína no se encuentra de manera soluble, lo que requiere de otros métodos para lograr la purificación soluble de la PPAD-NT.

Conclusiones: Se produjo con éxito la PPAD-NT recombinante, aunque de manera insoluble.

Palabras claves: PPAD-NT, *Porphyromonas gingivalis*, proteínas recombinantes, clonación, SDS-PAGE.

ABSTRACT

Production of a Peptidylarginine deiminase (PPAD) as a recombinant of *Porphyromonas gingivalis*

Background: The Peptidylarginine deiminase enzyme produced by *P. gingivalis* (PPAD) induces the conversion of arginine from citrulline into bacterial and human protein favouring the production of antibodies against citrullinated proteins. Several studies have evaluated the relation between anti-PPAD antibodies and an increase in rheumatoid arthritis (RA) but there is still controversy regarding it. Thus stems the importance of evaluating the presence of anti-PPAD in patients with RA. The recombinant PPAD is indispensable as an antigen for antibody evaluation in individuals with RA. **Objective:** to produce a recombinant PPAD-NT. **Materials and methods:** Primers were designed for the N-terminal fragment based on the PPAD sequence filed in the NCBI database. Afterwards the N-terminal was PCR amplified and cloned in the pGEM-R-T plasmid for insert propagation, the transformation was carried out in *Escherichia coli*. Top 10. The insert was tracked with PCR, the clones propagated and the extraction carried out. Insert restriction was carried out with *Xba*I and *Nsi*I enzymes, re-cloned in the plasmid with pET-CT expression and transformed into *E. coli* BL21. Clone tracking was done and insert direction was confirmed with PCR. Afterwards protein expression was induced with IPTG 1mM evaluated by SDS-PAGE in supernatants and cellular pellets in different times (2 hours, 4 hours, 6 hours and 18 hours) in order to confirm protein production. **Results:** Production of recombinant PPAD-NT was confirmed two hours after induction in the cellular pellets with a fragment of approximately 25kDa. No protein was found in the supernatants which indicates that the protein is found in a soluble state, requiring other methods for soluble purification of PPAD-NT. **Conclusions:** recombinant PPAD-NT was successfully produced even though in an insoluble state.

Key words: PPAD-NT, *Porphyromonas gingivalis*, recombinant proteins, cloning, SDS-PAGE.

1. Introducción

La periodontitis crónica es un proceso infeccioso que induce a la pérdida de hueso alveolar y pérdida de las estructuras de soporte del diente (Gabarrini *et al.*, 2015), en este proceso están involucradas diferentes especies bacterianas, pero *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* se han encontrado en grandes cantidades en pacientes con esta enfermedad. La periodontitis puede manifestarse clínicamente con la presencia de bolsas periodontales (mayores a 4 mm), inflamación gingival, hemorragia al sondaje; y radiográficamente se observa pérdida de hueso alveolar. Según el ENSAB IV (Estudio Nacional de salud bucal 2014), la mayor parte de la población colombiana (61.8%) sufre de periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada con un 43.46% de los sujetos.

Una de las bacterias más asociadas con esta enfermedad es *Porphyromonas gingivalis* que es un bacilo anaerobio facultativo Gram negativo, que expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, LPS, cápsula y la enzima PAD (peptidilarginina desiminasa), la cual se ha involucrado con enfermedades sistémicas como la Artritis reumatoide. Esta enzima se conoce como PPAD, por pertenecer a *P. gingivalis*.

La PPAD es capaz de inducir a la citrulinación de proteínas, que es un proceso en el cual hay una conversión del aminoácido arginina en citrulina, favoreciendo el cambio postraduccional de la proteína exponiendo epítopes, que serán reconocidos por el sistema inmunológico como no propios, generando autoanticuerpos. Esto lo hace tanto en proteínas bacterianas, como en proteínas humanas como en el fibrinógeno y la alfa enolasa, lo que puede exacerbar los procesos inflamatorios en cavidad oral y también de manera sistémica, ya que las proteínas citrulinadas conducen a la producción de anticuerpos (Cuéllar *et al.*, 2013).

En cuanto a la artritis reumatoide se conoce que es una poliartritis inflamatoria crónica de origen autoinmune y multifactorial caracterizada por sinovitis, depósito de fibrina y daño en el cartílago. Las causas de esta enfermedad no están bien establecidas, pero se conoce que la presencia de autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) es altamente específica de la artritis reumatoide (Cuéllar *et al.*, 2013).

Por lo tanto, es muy importante determinar la asociación entre los títulos de anticuerpos anti-PPAD y la actividad de la artritis reumatoide, y así poder ofrecer un tratamiento multidisciplinar a estos

pacientes para mejorar su calidad de vida, por lo anterior es necesario producir la proteína PPAD de manera recombinante para ser empleada como antígeno en la búsqueda de anticuerpos anti-PPAD en pacientes con artritis reumatoide.

2. Marco teórico

Enfermedad periodontal: es una de las patologías orales más comunes en la población Colombia, ya que afecta a cerca del 50% de la población. En su forma generalizada, el 12% de los individuos menores de 35 años muestra pérdida de inserción, la que aumenta a 42% después de los 60 años. En la forma avanzada, el 10% de la población presenta pérdida de inserción avanzada (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007).

Esta enfermedad es inducida por la placa bacteriana, que está constituida por componentes salivares y diferentes especies bacteriana en continuo crecimiento. El término “biopelícula” se usa para referirse a una comunidad de bacterias envueltas en una masa extracelular que se acumula en una superficie. Las diferentes especies acumuladas en la biopelícula pueden ayudar a proteger contra la colonización por patógeno o constituir el inicio, progresión y destrucción de las estructuras periodontales. Algunas especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* y *Treponema denticola* aumentan en frecuencia y concentración en la biopelícula de pacientes con periodontitis en comparación con la población sana. La presencia de altas concentraciones de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* se asocian con la progresión de las lesiones periodontales (Mayorga-Fayad *et al.* 2007).

Es por esta razón, que se han realizado varias investigaciones previas con el fin de establecer la microbiota oral involucrada, la evolución de la enfermedad y su relación con algunas otras enfermedades sistémicas.

Periodontitis: es un proceso infeccioso que induce a la pérdida de hueso alveolar y pérdida de las estructuras de soporte del diente (Gabarrini *et al.*, 2015), en este proceso están involucradas diferentes especies bacterianas, pero *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* se han encontrado en grandes concentraciones en pacientes con lesiones periodontales (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007)

Esta enfermedad puede manifestarse clínicamente con la presencia de bolsas periodontales (mayores a 4 mm), inflamación gingival, hemorragia al sondeo y radiográficamente se observa pérdida de la altura ósea. Esta patología puede clasificarse en: periodontitis crónica, periodontitis agresiva y periodontitis asociada a enfermedades sistémicas, esta clasificación depende de la

progresión, los microorganismos involucrados y otros factores que puedan contribuir a la enfermedad (Armitage *et al.*, 1999).

En cuanto a los factores de riesgo que se han asociado a esta enfermedad se encuentran el tabaquismo, la edad, el género, entre otros. Esto lo confirma la investigación realizada por Schützer Ragghianti *et al.*, en 2004 ya que en los resultados se muestra un aumento en la pérdida de inserción y un mayor acumulo de placa con el aumento de la edad. El grupo masculino mostró significativamente mayores números en cuanto a pérdida de inserción que la mujer. Los fumadores tenían bolsas periodontales y pérdida de inserción significativamente más altos que los no fumadores. El envejecimiento, el hábito de fumar, el sexo masculino y el porcentaje de sitios con placa se asociaron con un gran aumento de la destrucción periodontal (Schützer Ragghianti *et al.*, 2004).

Según el ENSAB IV (Estudio Nacional de salud bucal 2014), la mayor parte de la población colombiana (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada con un 43.46% de los sujetos, de los cuales la mayoría son hombres entre grupos de edad de 35 a 64 años.

***Porphyromonas gingivalis*:** es un cocobacilo anaerobio facultativo Gram negativo, inmóvil y no esporulado que pertenece a los bacteriodes negro pigmentados, que expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, enzimas proteolíticas, LPS y cápsula. Además de esto, se ha descubierto que esta bacteria expresa una enzima PAD (peptidilarginina desiminasa), la cual se ha involucrado con enfermedades sistémicas como la Artritis reumatoide (Gabarrini *et al.*, 2015).

Como un soporte para el posible papel de *P. gingivalis* en la patogénesis de la artritis reumatoide, se ha encontrado que los anticuerpos contra *P. gingivalis* se asocian con la artritis reumatoide y con anticuerpos para proteínas citrulinadas. Además, se ha detectado el ADN de *P. gingivalis* en las muestras de fluido sinovial y de plasma de pacientes con artritis reumatoide, y la coexistencia de artritis reumatoide y periodontitis aumentó la probabilidad de encontrar ADN de *P. gingivalis* en estos sitios (Totaro *et al.*, 2013).

Enzima PAD (peptidilarginina desiminasa): Las PAD son enzimas que catalizan la reacción de modificación postraducciona de los residuos de arginina en citrulina.

Existe cinco isoformas de PAD humanas, (PAD-1, 2, 3, 4 y 6) codificadas por cinco genes localizados en el cromosoma 1, a diferencia de PAD-4, la cual se encuentra en el núcleo, las demás enzimas PAD se encuentran en el citoplasma celular. Las isoformas PAD-2 y PAD-4 son de particular interés ya que frecuentemente se encuentran en sitios de patología, incluyendo los tejidos de artritis reumatoide y periodontitis (Montgomery *et al.*, 2015).

La enzima PAD (peptidilarginina desiminasa) producida por *P. gingivalis* se conoce como PPAD, es una enzima con actividad de amino deiminasa similar a la comprometida en la etiología de artritis reumatoide (Mangat *et al.*, 2010). Las enzimas PAD convierten los residuos de arginina de los polipeptidos en citrulina, cambiando la carga del péptido y como consecuencia de esto la conformación tridimensional de la proteína exponiendo epítopes crípticos los cuales favorecen la generación de autoanticuerpos, posiblemente implicados en la iniciación de la artritis reumatoide (Mangat *et al.*, 2010; Maresz *et al.*, 2013; Quirke *et al.*, 2014).

La arginina es un aminoácido con carga positiva frecuentemente encontrado en la superficie de proteínas formando así enlaces con otros aminoácidos. Estas características lo constituyen en un aminoácido importante en la organización tridimensional de proteínas y en la interacción con otras moléculas biológicas. Por tanto, las modificaciones de la arginina pueden alterar la estructura tridimensional y exponer epítomos previamente ocultos al sistema inmune (Molano *et al.*, 2012).

Sin embargo se cree que las PPAD, no pueden actuar de manera independiente sino que requieren de la colaboración de las gingipaínas para poder generar citrulinación en las proteínas bacterianas y del hospedador, es probable que las Arg-gingipaínas después de clivar proteínas en el extremo carboxilo de la arginina, deje este residuo en el extremo terminal favoreciendo el reconocimiento por la enzima PPAD y así generar péptidos citrulinados (Montgomery *et al.*, 2015; Maresz *et al.*, 2013; Quirke *et al.*, 2014).

Laugisch *et al.*, (2015) reportan un aumento en la actividad de la PPAD en el periodonto de pacientes con artritis reumatoide y proponen que *P. gingivalis* participa en la citrulinación en tejidos distantes del periodonto.

Por otra parte, otros autores como König *et al.*, (2014) sugieren que la PPAD no es la responsable en la pérdida de la tolerancia inmunológica, sugiriendo que *P. gingivalis* no tiene relación con el desarrollo de la artritis reumatoide, aunque en ese estudio no se evaluaron las gingipaínas como

posible coadyuvante de la citrulinación. No es claro cuál es el papel de esta bacteria en el desarrollo de la artritis y si las gingipaínas juegan un papel importante o no este proceso.

Citrulinación: La citrulinación es una modificación postraducciona catalizada por las enzimas peptidylarginine deiminases (PAD). En esta reacción, un residuo de arginina dentro de una proteína se convierte en el aminoácido citrulina. Esta modificación conduce a una pérdida de carga positiva, a una reducción en la capacidad de unión de hidrógeno y, posteriormente, en cambios conformacionales y funcionales de la proteína (Routsias *et al.*, 2011 y Molano *et al.*, 2012; Gabarrini *et al.*, 2015).

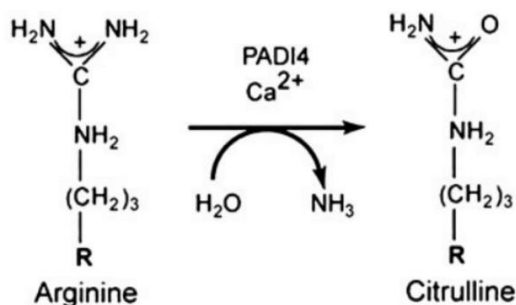


Figura 1. Citrulinacion de proteínas. Tomada de Routsias JG *et al.*, 2011 Autopathogenic correlation of periodontitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology*

Aunque la citrulinación es un proceso fisiológico en tejido sano, puede ser patológica cuando se pierde el equilibrio de tolerancia a proteínas citrulinadas como ocurre en pacientes con artritis reumatoide (Molano *et al.*, 2012).

Este proceso proporciona propiedades neo-antigénicas a la molécula de proteína, ya que estas proteínas interfieren con la actividad del complemento, inactiva los factores de crecimiento epidérmico y contribuye a la infección de fibroblastos gingivales y la inducción de la síntesis de prostaglandina E₂ (Routsias *et al.*, 2011). La PPAD es capaz de hacer el proceso de citulinación en proteínas bacterianas y también en proteínas humanas incluyendo el fibrinógeno y la alfa

enolasa; esto conduce a la producción de anticuerpos contra proteínas citrulinadas (Cuéllar *et al.*, 2013).

La citrulinación por PPAD aumenta la virulencia de *P. gingivalis* debido a que en este proceso hay producción de amoníaco lo que tiene un efecto negativo sobre la función de los neutrófilos y la activación del sistema de complemento. (Molano *et al.*, 2012)

Este proceso de citrulinación, puede exacerbar los procesos inflamatorios en cavidad oral y también de manera sistémica. Una de las enfermedades relacionadas con la citrulinación es la artritis reumatoide.

La artritis reumatoide: es una poliartritis inflamatoria crónica de origen autoinmune y multifactorial caracterizada por sinovitis, depósito de fibrina y daño en el cartílago. La mayoría de las veces, la artritis reumatoide afecta las articulaciones en ambos lados del cuerpo. Las articulaciones más afectadas son las muñecas, los dedos de las manos, las rodillas, los pies y los tobillos.

La enfermedad a menudo comienza de manera lenta y los síntomas iniciales pueden incluir dolor articular leve, rigidez y fatiga. Los síntomas articulares pueden incluir la rigidez matutina, las articulaciones pueden sentirse sensibles y rígidas cuando no se usan durante cierto tiempo, el dolor articular a menudo se siente en la misma articulación en ambos lados del cuerpo, con el tiempo, las articulaciones pueden perder su rango de movimiento y volverse deformes.

Las causas de esta enfermedad no están bien establecidas, pero se conoce que la presencia de autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) es altamente específica de la artritis reumatoide (Cuéllar *et al.*, 2013).

Uno de los factores de riesgo que se conoce es el tabaquismo, ya que el fumar induce al desarrollo de anticuerpos para las proteínas citrulinadas, como se evidencia en poblaciones del norte de Europa y las estadounidenses, pero pocos estudios han abordado la relación de fumar con subconjuntos específicos de ACPA en los años previos de la aparición de la enfermedad. En el estudio realizado por Fisher *et al.*, en 2015 se concluyó que el fumar está asociado al aumento de ACPA y recientemente, un estudio sueco encontró que el tabaquismo se asoció con algunas, pero no todas las especificidades ACPA en las muestras de los sujetos que más tarde desarrollaron artritis reumatoide (Fisher *et al.*, 2015).

Unas de las proteínas citulinadas más asociadas en la artritis reumatoide son el fibrinógeno y la alfa enolasa. Se han encontrado autoanticuerpos contra el fibrinógeno citrulinado en aproximadamente un 60 % de los pacientes con artritis reumatoide. La alfa enolasa es una proteína multifuncional relacionada con el metabolismo de la glucosa y se encuentran anticuerpos contra la alfa enolasa en 40-60 % de los pacientes con artritis reumatoide (Cuéllar *et al.*, 2013).

Relación de periodontitis y de artritis reumatoide: Aún faltan investigaciones para determinar las consecuencias de *P. gingivalis* y PPAD a nivel sistémico, pero existen investigaciones, como la realizada por Quirke *et al.*, (2014) en la que se encuentra un aumento de IgG anti-PPAD en pacientes con artritis reumatoide que en el grupo control, y estos niveles altos de IgG podrían exacerbar los síntomas de los pacientes con artritis; lo cual podría mostrar una asociación entre las dos patologías. Pero existen también estudios, como el realizado por König *et al.*, en el cual se muestra que la PPAD de *P. gingivalis* no es reconocida por los anticuerpos anti-PPAD de los pacientes con artritis reumatoide, con lo cual queda no se muestra una relación directa entre las enfermedades.

3. Planteamiento del problema

La periodontitis crónica es un proceso infeccioso que induce a la pérdida de hueso alveolar y pérdida de las estructuras de soporte del diente (Gabarrini *et al.*, 2015). En Colombia, según el ENSAB IV (Estudio Nacional de salud bucal 2014), es una de las patologías orales más comunes ya que cerca del 61.8% de la población evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis crónica moderada con un 43.46%.

P. gingivalis es un periodontopatógeno que se ha encontrado en diferentes tejidos y por lo tanto es muy estudiado. Este microorganismo es un cocobacilo anaerobio facultativo Gram negativo, que expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, enzimas proteolíticas, LPS y cápsula. Además de estos, se ha descubierto que esta bacteria expresa una enzima PAD (peptidilarginina deiminasa), la cual se ha involucrado con enfermedades sistémicas como la artritis reumatoide (Gabarrini *et al.*, 2015).

La enzima PAD producida por *P. gingivalis* se conoce como PPAD, y esta se considera un factor de virulencia porque induce a la citrulinación, que es un proceso en el cual hay una conversión del aminoácido arginina en citrulina (Routsias *et al.*, 2011). Esta enzima es capaz de hacer el proceso de citrulinación en proteínas bacterianas y también en proteínas humanas incluyendo el fibrinógeno y la alfa enolasa; esto conduce a la producción de anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA). Las proteínas citrulinadas pueden inactivar los factores de crecimiento epidérmico e inducen a la síntesis de prostaglandina E2 y de esta manera se pueden exacerbar los procesos inflamatorios en cavidad oral y también de manera sistémica como en la artritis reumatoide (Routsias *et al.*, 2011).

Aún faltan investigaciones para determinar el vínculo entre *P. gingivalis* y PPAD a nivel de enfermedades sistémicas como la artritis reumatoide, pero existen investigaciones, como la realizada por Quirke *et al.*, (2014) en la que se encuentra un aumento de IgG anti-PPAD en pacientes con artritis reumatoide que en el grupo control, sin embargo otros autores como König *et al.*, (2015) muestra que la PPAD de *P. gingivalis* no es reconocida por los anticuerpos anti-PPAD de los pacientes con artritis reumatoide, por lo tanto no se puede hablar de una relación directa entre las enfermedades.

Por lo anterior es necesario evaluar en otras poblaciones la presencia y títulos de anticuerpos anti-PPAD en pacientes con artritis reumatoide, para realizar esta detección es indispensable tener disponible el antígeno que en este caso es la proteína PPAD, por lo que este estudio se propuso producir de manera recombinante esta proteína.

4. Justificación

La prevalencia de la enfermedad periodontal en Colombia es alta de acuerdo con lo reportado por el ENSAB IV, la mayor parte de la población (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada con un 43.46% de la población, de los cuales la mayoría de los sujetos están entre los grupos de edad de 35 a 64 años, esto indica que la periodontitis es una patología con gran prevalencia en nuestro país.

En estudios previos se ha reportado que la periodontitis se ha asociado fuertemente a enfermedades como aterosclerosis, parto pretérmino y artritis reumatoide. Esto convierte a la periodontitis en un factor de riesgo a nivel sistémico, que no es muy tenido en cuenta en nuestro sistema de salud, por lo tanto, se hace necesario ampliar y dar a conocer esta patología como agente predisponente de enfermedades sistémicas.

El link entre la enfermedad periodontal y la artritis reumatoide podría ser la presencia de *P. gingivalis* en el surco gingival de los pacientes y específicamente la presencia de la enzima PPAD en esta bacteria que es una proteína constitutiva de esta bacteria, no es claro cuál es el papel de PPAD en el desarrollo de la artritis reumatoide, varios autores (Quirke *et al.*, 2014; Montgomery *et al.*, 2015; König *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2016) han evaluado la presencia de anticuerpos anti-PPAD en pacientes con artritis reumatoide, sin embargo existe una controversia entre la asociación entre enfermedad periodontal y artritis reumatoide, probablemente por la diferencia entre poblaciones, tamaño de muestra y grupos de comparación.

Rodríguez *et al.*, (2009), produjeron una PPAD recombinante que es la empleada en la mayoría de los estudios, es una proteína de 61kD, que podría presentar inconvenientes para el proceso de clonación. El propósito de este estudio fue producir la PPAD recombinante, pero dividida en dos fracciones: N-terminal y C-terminal, para en estudios posteriores ser empleada como antígeno y así poder evaluar la asociación entre la periodontitis y la artritis reumatoide, se podría pensar en un tratamiento multidisciplinar para la artritis, ya que se recomendaría la terapia periodontal en estos pacientes.

5.Objetivos

5.1 Objetivo general:

Producir la PPAD recombinante en dos fracciones N-terminal y C-terminal.

5.2 Objetivos específicos:

1. Expresar la proteína PPAD en *E. coli* BL21 y caracterizarla por métodos de inmunoquímica.
2. Purificar la PPAD a partir de sobrenadantes o células de *E. coli* BL21.

6. Metodología del proyecto

6.1 Tipo de estudio: Este estudio experimental *in vitro*

6.2 Materiales y métodos:

6.2.1 Diseño de primer para la fracción N-Terminal

Los primers se diseñaron con sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *NsiI* para que el inserto tenga extremos cohesivos y la inserción sea direccionada para el plásmido Champion™ pET302/NT-His Invitrogen.

Para la confirmación de los primers se empleó el programa *on line* Primer 3 Plus (<http://primer3plus.com>) y fueron verificados usando a herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se realizó una PCR *in silico* y se confirmó que el marco abierto de lectura no se corra para este el fragmento haciendo la traducción a proteína mediante el programa ExPASy (<https://www.expasy.org/>), esta traducción fue usada para confirmar que el producto corresponde a PPAD empleando la herramienta BLAST de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/>).

6.2.2 PCR para fracción N-terminal

Se estandarizó la PCR con la Taq polimerasa Go®Taq G2 (Promega), con las siguientes condiciones: mezcla de reacción contiene MgCl₂ 2 mM, buffer 1X [GoTaq Polimerasa® (Promega)], dNTPs 0,4 mM, primers 1μM y DNA GoTaq Polimerasa® (Promega) 0,125U y 3μL de DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277.

Se corrió en un termociclador T100 (Biorad®) con un ciclo inicial de 94°C durante 50 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos, y un paso final de extensión de 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) con 0,5 μg/ml de bromuro de etidio. Visualizados en un digitalizador de imágenes GelDoc (Biorad®), la fracción N-terminal de logro evidenciar a una altura de 699pb.

6.2.3 Clonación de facción N-terminal de PPAD

El producto previamente amplificado se precipitó con isopropanol y se realizaron 2 lavados con etanol absoluto grado molecular, se realizó cuantificación del producto purificado (167,4ng/μL) y se realizó la clonación siguiendo el siguiente esquema usando como vector el plásmido pGEM R-T (50ng), este plásmido es empleado para propagación del inserto:

La cantidad de DNA purificado debe estar en proporción al número de moléculas del plásmido y se calcula así:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{Tamaño del vector (kb)}} \times \text{Inserto: ratio vector molar} = \text{ng de inserto}$$

Tabla 1. Preparación de ligación para la clonación en el plásmido pGEM

Reactivo	Reacción PPAD-NT
2X Rapid Ligation Buffer	5μL
pGEM R-T (50ng)	1 μL
Producto de PCR purificado	0,5 μL
T4 DNA ligasa	1 μL
H ₂ O destilada desionizada estéril	2,5 μL
Volumen total	10 μL

La ligación se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente.

6.2.4 Transformación en *E. coli* Top 10

La transformación se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se mezcló la totalidad del volumen de ligación (10 μL) con 30 μL de células competentes de *E. coli* Top 10, se incubó durante 30 minutos en hielo e inmediatamente después se incubó a 42°C durante un minuto, pasado el tiempo de incubación se pasó a hielo y se incubó durante 5 minutos.
2. Se adicionaron 200μL en caldo SOC, y se incubó en agitación durante 2 horas a 37°C

3. Pasadas las dos horas de incubación se plaqueo en agar LB (Luria Bertani) suplementado con 100µg/mL de ampicilina, se adicionaron 100 µL de IPTG (100nM) (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y 20 µL de X-Gal (50mg/mL) (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido).
4. Se incubó durante 24 horas a 37°C, pasado el tiempo de incubación se realizó la observación de las colonias. Las colonias blancas indican que hubo transformación con el inserto.
5. Las colonias se repicaron en LB suplementado con ampicilina con 100µg/mL de ampicilina, para hacer rastreo del inserto por PCR.

3.2.5 Rastreo del inserto en las colonias después de la transformación

Se realizó extracción de DNA por choque térmico de cada una de las colonias que al parecer tienen el fragmento, y este fue empleado para realizar la PCR como se indicó previamente para confirmar la presencia del inserto.

6.2.6 Extracción de plásmidos a partir de las colonias que presentaron el inserto.

Cada colonia fue sembrada en 5mL de caldo LB (Luria Bertani) con 100µg/mL de ampicilina y se incubó durante 18 horas en agitación (150rpm) a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 3500rpm a 10°C, se retiraron los sobrenadantes.

Se empleó un protocolo *in house* para la extracción de plásmidos, para lo anterior se adicionaron 250 µL de la solución I Glucosa 50mM, Tris HCl 25mM pH8,0 , EDTA 2,5mM pH8,0, RNAsa 10µg/mL) y 250 µL de solución II (lisis) (NaOH 0,2M, SDS1%), se mezcló por inversión hasta homogenizar e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego se agregó la solución III de denaturación (acetato de potasio 3MpH4,8) y se mezcla por inversión e incubó durante 5 minutos a 4°C, se centrifugó a 12.000rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a nuevo tubo estéril.

En este paso ya se tienen los plásmidos en el sobrenadante que se deben precipitar con 2 volúmenes de etanol frío y se incubó a -80°C durante una hora. Pasado este tiempo de centrifugo a 14.000rpm durante 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, luego se realizó un lavado con etanol (grado molecular) y se centrifugo a 14.000 rpm a 4°C durante 10 min.

Para eliminar el sobrenadante se secó el DNA plasmidico en el Savat DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific) durante 5 minutos y se resuspendió en 50 μL de H_2O destilada desinizada estéril y se corrió una electroforesis en un gel al 2%.

6.2.7 Cuantificación de plásmidos y confirmación del inserto en los plásmidos obtenidos.

Se realizó la cuantificación para confirmar concentración y pureza de los plásmidos obtenidos con NanoDrop (Thermo Scientific).

La presencia del inserto se confirmó por PCR como se describió previamente.

6.2.8 Digestión del plásmido pGEM con PPAD-NT

Con el fin de obtener una buena cantidad del fragmento con extremos cohesivos se deben realizar digestión enzimática con las enzimas de restricción *XbaI* y *NsiI*, para esto se siguió el siguiente protocolo, usando una concentración de 140ng/ μL de plásmido:

Tabla 2. Restricción enzimática con *XbaI* del pGEM-PPAD-NT y el plásmido de expresión pET-CT

Reactivo	pGEM-PPAD-NT	pET-CT
Buffer tango 10X	2 μL	2 μL
DNA	8 μL	8 μL
Enzima <i>XbaI</i>	2 μL	2 μL
H_2O grado molecular	8 μL	8 μL
Volumen total	20 μL	20 μL

Se incubó a 37°C durante 16 horas, posteriormente la reacción se detiene a 65°C durante 20min, terminada la primera digestión se toma una alícuota para confirmar la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 3. Restricción enzimática con *NsiI* del pGEM-PPAD-NT y el plásmido de expresión pET-CT

Reactivo	pGEM-PPAD-NT	pET-CT
Plásmido pET-CT	-----	13 µL
Producto de la primera restricción	13 µL	-----
NE Buffer (1X)	2µL	2µL
Enzima <i>NsiI</i>	8µL	8µL

Esta segunda restricción se lleva a cabo durante 3 horas a 37°C, terminada la segunda digestión se toma una alícuota para confirmar la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Una vez confirmada la digestión del producto y del vector de expresión por electroforesis, el producto fue purificado a partir de gel de agarosa usando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.2.9 Clonación del producto en el plásmido de expresión pET

Tabla 4. Preparación de ligación para la clonación en el plásmido pGEM

Reactivo	Reacción PPAD-NT
5X Ligation Buffer	5µL
pET-CT (70ng) (después de digestión)	2 µL
DNA PPAD-NT (después de digestión)	3 µL
T4 DNA ligasa (Invitrogen)	3 µL
H ₂ O grado molecular	0 µL
Vol total	10 µL

La ligación se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche para proceder a la transformación en *E. coli* BL21

6.2.10 Transformación en *E. coli* BL21

La cepa de *E. coli* BL21 es usada para la clonación y de fragmentos de DNA y posterior expresión de proteínas,

La transformación se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se mezcló 10 μ L con 50 μ L de células competentes de *E. coli* BL21, se incubó durante 30 minutos en hielo e inmediatamente después se incubó a 42°C durante un minuto, pasado el tiempo de incubación se pasó a hielo y se incubó durante 2 minutos.
2. Se adicionaron 200 μ L en caldo SOC, y se incubó en agitación durante 4 horas a 37°C a 150 rrp.
3. Pasado el tiempo de incubación se plaqueó en agar LB (Luria Bertani) suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina.
4. Se incubó durante 24 horas a 37°C, pasado el tiempo de incubación se realizó la observación de las colonias, las colonias que crecen en el medio con antibiótico son consideradas posibles clones y se les debe realizar rastreo del inserto por PCR como se describió inicialmente.

6.2.11 Verificación de la dirección del inserto de PPAD-NT

Se monta una PCR con primers del vector para confirmar la dirección del inserto con los primers del promotor del plásmido T7 directo y reverso, las condiciones de la PCR fueron las mismas previamente descritas.

6.2.12. Inducción de expresión de la proteínas PPAD-NT en *E. coli* BL21

Se confirmó la presencia del clon en la colonia 3 por lo que se trabajó con esta colonia, se sembró en caldo LB con ampicilina (100 μ g/mL) durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 de este cultivo en 7mL de caldo LB, se incubó hasta alcanzar una DO entre 0,4 y 0,5 a una longitud de onda de 600nm. Una vez alcanzada la DO se realizó la inducción con IPTG a una concentración de 1mM.

Se realizó inducción por 2, 4, 6 y 18 horas para confirmar el tiempo que requiere la inducción de la proteína, pasado el tiempo de incubación se separó por centrifugación el pellet celular y el sobrenadante. Posteriormente se corrió SDS-PAGE teñido con azul de coomasie para confirmar la presencia de la proteína recombinante.

7.Resultados

7.1 Secuencia de proteína y primers diseñados

En la figura 1 se muestra el BLAST de la proteína para confirmar la secuencia con la que se diseñaron los primers para la clonación.



Figura 1. BLAST de proteínas de la traducción *in silico* del fragmento de PPAD NT

Una vez se encontró la secuencia se diseñaron los primers y se obtuvieron las siguientes secuencias:

Primers para PPAD N-terminal:

PPAD F1: 5'- ATGCATTCTAGAAATGAAAAAGCTTTTACAGGC-3'

PPAD R699: 5'- TCGTGCAATGCATCAAGATCCGAACGGCGAATAT-3'

7.2 Amplificación del fragmento PPAD-NT por PCR

Después de la amplificación se obtuvo un fragmento de 699pb como se esperaba, usando DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83.

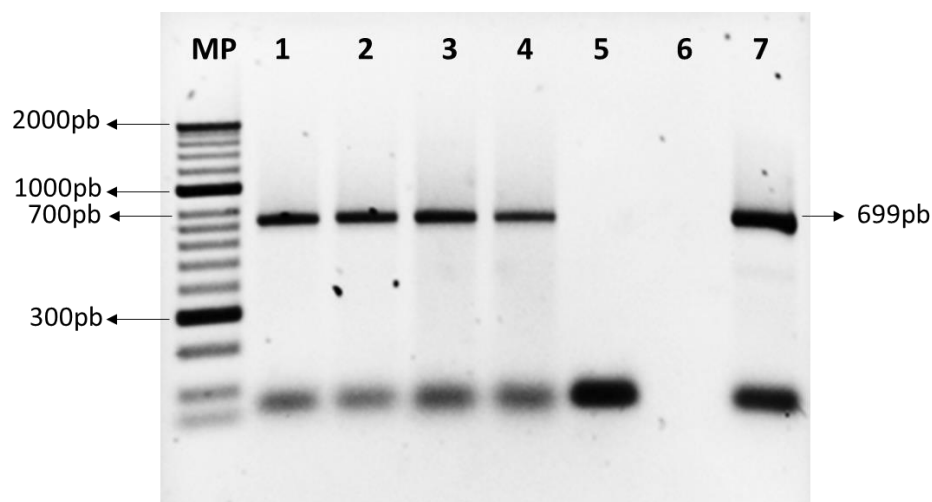


Figura 2. Gel de agarosa para la amplificación del fragmento PPAD-NT, confirmación para ser clonado. MP: marcador de peso molecular, líneas 1 y 2: *P. gingivalis* ATCC 33277, líneas 3 y 4 *P. gingivalis* W83, líneas 5 y 6 controles negativos y línea 7 control positivo.

7.3 Clonación del fragmento previamente amplificado en *E. coli* Top 10

Se logró la clonación del fragmento en *E. coli* Top 10 en 3 colonias que crecieron en LB con ampicilina, IPTG y XGal, se recuperaron 3 colonias blancas que confirman la interrupción de operon Lac, además de la resistencia a ampicilina. Se rastrearon las colonias para la presencia del fragmento por PCR, lo que se puede evidenciar en la figura 3.

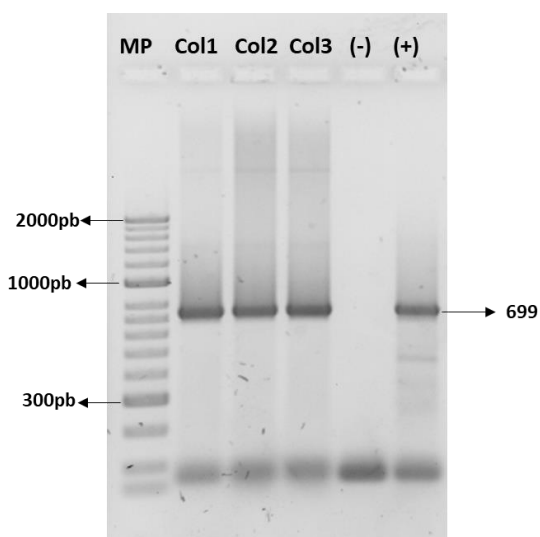


Figura 3. Confirmación del fragmento PPAD-NT en las tres colonias seleccionadas

7.4 Extracción de plásmidos con el inserto a partir de las colonias previamente confirmadas

Se realizó extracción de los plásmidos a partir de las colonias previamente clonadas, se ensayaron dos métodos de extracción y se logró obtener buena concentración de plásmidos con el inserto. En la figura 4 se observa la comparación de los dos métodos, donde se observa que se puede usar cualquiera de los dos métodos. A partir de los plásmidos de vuelve a confirmar la presencia del inserto.

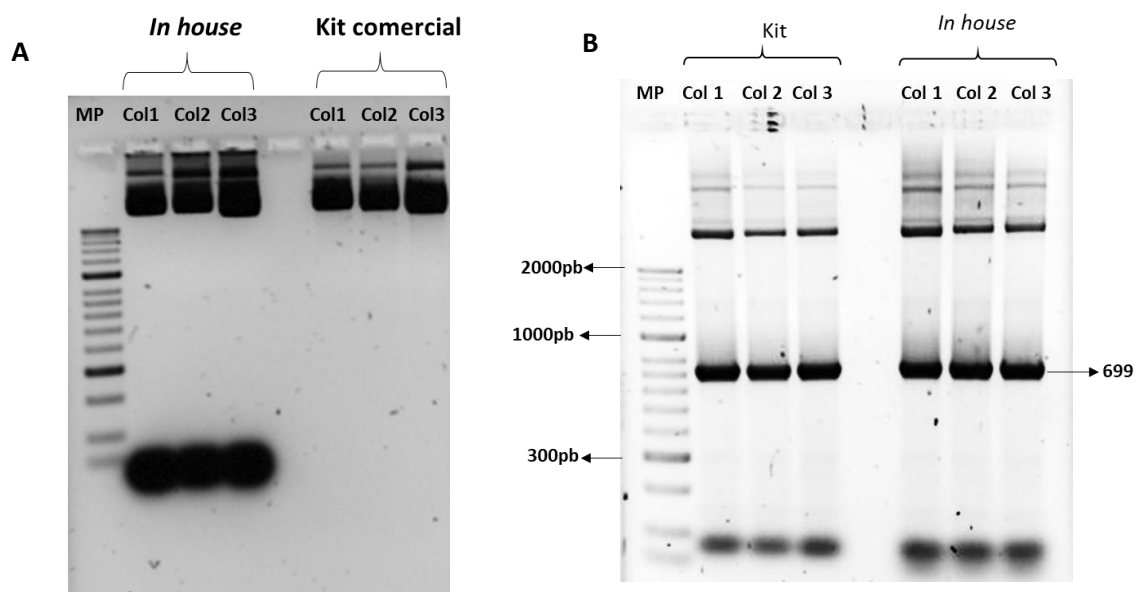


Figura 4. A) Plásmidos extraídos de las colonias con el inserto. B) Confirmación de la presencia del inserto de PPAD-NT

A partir del gel se purificó el fragmento usando un kit comercial para ser clonado en el plásmido de expresión.

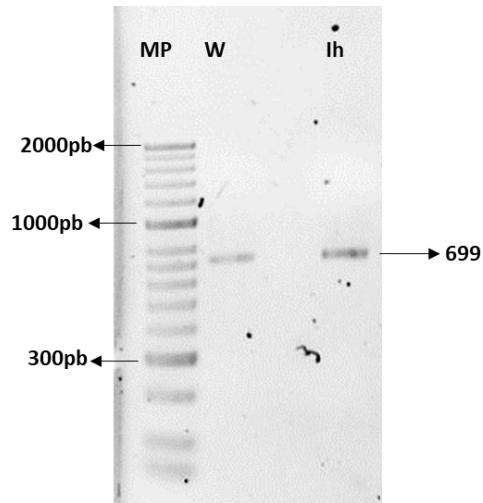


Figura 5. Confirmación del fragmento después de la pacificación

Una vez realizado el proceso de clonación se confirmó la presencia del inserto y se clonó en *E. coli* BL21, se confirmó la presencia del inserto por PCR como se realizó antes, en esta oportunidad solo se encontró en una de las tres colonias que se rastrearon (ver figura 6)

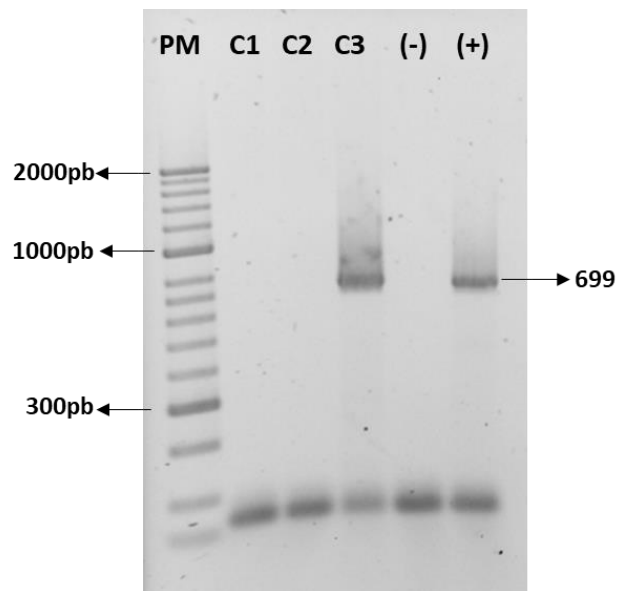


Figura 6. Rastreo del fragmento en *E. coli* BL21. Se confirmó la presencia del inserto únicamente en la colonia 3.

Además de la presencia del inserto se debía confirmar la dirección del fragmento con diferentes combinaciones de primers, lo que se confirmó con la presencia del inserto de 699pb en el numeral 1.

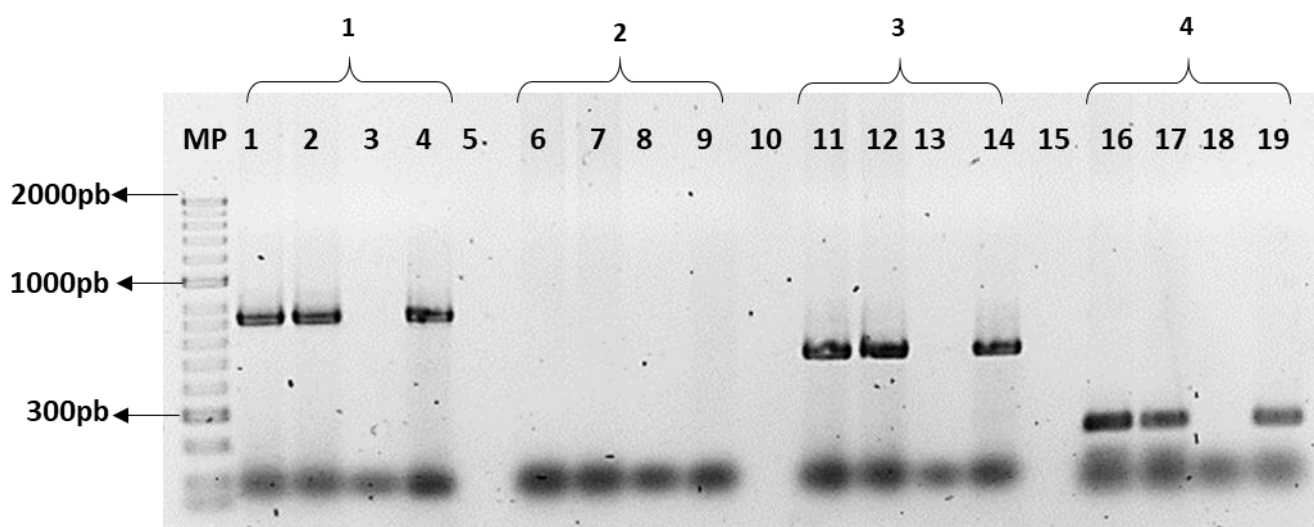


Figura 7. Confirmación de la direccionalidad del fragmento, se confirma que el inserto está correctamente insertado en el numeral 1.

Una vez se confirmó la direccionalidad se realizó la inducción de la expresión de la proteína PPAD-NT como se describió en materiales y métodos, se confirmó la expresión de la proteína a las horas de inducción únicamente en los pellets bacterianos en un tiempo de inducción de 2 horas con IPTG se puede observar una proteína de aproximadamente 25kDa como se observa en la figura 8.

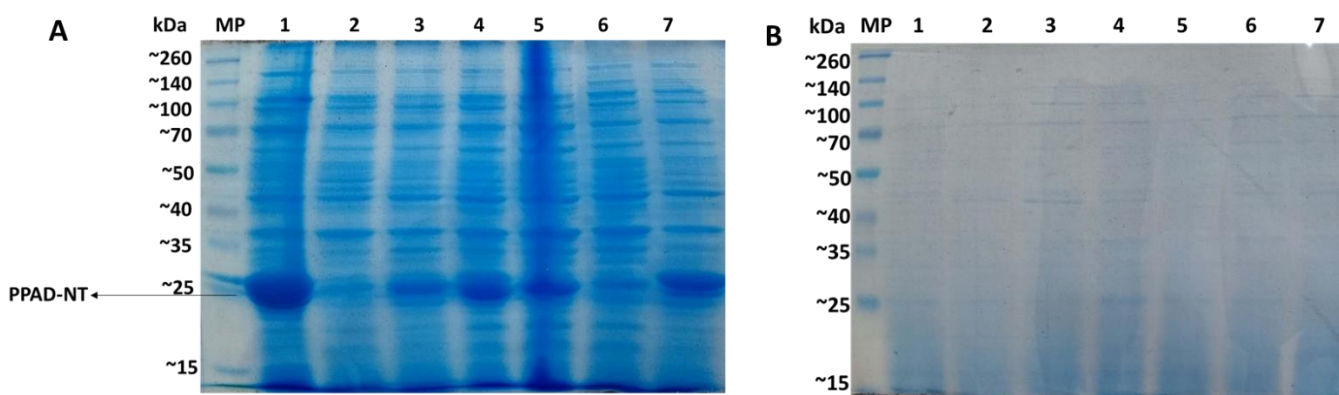


Figura 8. SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie. A) Pellets celulares. B) Sobrenadantes de cultivo. MP: Marcador de peso molecular. 1: Inducción a dos horas; 2: Sin inserto; 3: Sin inducción; 4: Inducción a las 4 horas; 5: sin inserto 4 horas; 6: Sin inducción 4 horas; 7: Inducción 6 horas.

8.Discusión

La producción de la parte N-terminal de PPAD se logró expresar con éxito en el interior de *E. coli* siguiendo el protocolo de Rodríguez *et al.*, (2009). Pero esta parte de la proteína no se encuentra soluble, ya que se encuentra internamente en la bacteria, para esto es necesario solubilizar y purificar esta proteína recombinante. Para la purificación de proteínas es necesario clasificarlas a partir de su forma de expresión en dos grupos: proteínas solubles e insolubles. Las proteínas solubles son aquellas secretadas al medio extracelular y las insolubles son aquellas que son expresadas intracelularmente, esto es importante, ya que para cada una de ellas existe diferentes técnicas de purificación.

Para las proteínas solubles, comúnmente se utiliza la cromatografía de lecho o cama expandida que es una técnica cromatográfica en la cual la proteína es purificada a partir de un extracto crudo, o también se utiliza la técnica de marcadores de afinidad que consiste en la adición a las proteínas de una cola de polihistidina que permite la purificación de estas por medio de una cromatografía de afinidad por iones metálicos.

Para las proteínas insolubles es necesario la ruptura de las células que la contienen. Existen varios métodos para lograr esto, como son: ciclos de congelación/descongelación repetidos, ultrasonido, homogenización por alta presión o permeabilización con solventes orgánicos. La elección del método depende de la fragilidad de la proteína y de la célula en que se encuentre. Las proteínas recombinantes que se acumulan intracelularmente en *E. coli* frecuentemente se depositan en forma de cuerpos de inclusión. (García et al., 2013)

Cuando la proteína se encuentra en forma de cuerpos de inclusión, es necesario realizar una ruptura celular, una centrifugación a baja velocidad, para eliminar contaminantes, un lavado de los cuerpos de inclusión que se realiza con altas concentraciones de desnaturizantes de proteínas, tales como 6 a 8 M de guanidina, HCl o urea, y se debe realizar la extracción de proteínas y su posterior purificación (Wingfield, 2015).

La purificación de proteínas es un paso esencial para su caracterización funcional y estructural. Para esto, se le agrega un marcador a la proteína y este debe ser eliminado porque puede interferir con la estructura y actividad de la proteína (Ibe *et al.*, 2015).

Rodríguez *et al.*, en el 2009, realizó la purificación de PPAD usando el protocolo Novagen. en este artículo describe que los sedimentos celulares se descongelaron y luego se resuspendieron con 6 ml de tampón de lisis (Tris / HCl 50 mM, pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 0,5% y Imidazol 10 mM) / litro de cultivo. Esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, la suspensión celular se sonicó dos veces durante 20 segundos al 70% del ciclo de trabajo y luego se añadió PMSF a una concentración final de 0,5 mM. Los restos celulares se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos a 20 ° C y se recuperó el sobrenadante. Los 80 ml de sobrenadante se mezclaron con 15 ml de resina Ni⁺-NTA (NaCl 400 mM, Tris / HCl 50 mM, pH 7,8 e imidazol 10 mM) y se agitó suavemente durante 1 hora. La mezcla se empaquetó luego en una columna, y el exceso de líquido se retiró de la columna por flujo de gravedad. La resina se lavó una vez con 2 volúmenes de columna de tampón de unión y cuatro veces con dos volúmenes de columna de tampón de lavado que consistía en NaCl 400 mM, Tris / HCl 50 mM, imidazol 25 mM, pH 7,8. La PAD se eliminó usando dos volúmenes de tampón de elución que consistía en NaCl 400 mM, Tris / HCl 50 mM e imidazol 250 mM a pH 7,8. Y posteriormente se usó la cromatografía de filtración en gel para estimar la masa molecular de PAD purificada. Los pasos de purificación permitieron el aislamiento de aproximadamente 1,75 mg de PAD por litro de cultivo.

Espejo *et al.*, en el 2004 produjeron la proteína recombinante humana hsc70, y esta fue purificada utilizando una resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen on line) en agitación a 100 rpm sobre hielo durante 2 horas. posteriormente, la resina se lavó tres veces en buffer de lavado pH 6.3 (NaH₂ PO₄ 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Urea 8 M, Tween 20 0.05%, Imidazol 5 mM), y se eliminó con una solución de elución pH 4.5 (NaH₂ PO₄ 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Urea 8 M, Tween 20 0.05%, Imidazol 250 mM). Todas las soluciones fueron suplementadas con PMSF (Sigma Chemical Co) 1 mM como inhibidor de proteasas. La proteína eluida se dializó durante 24 horas en una solución fosfato (NaH₂ PO₄ 0.2 M, Na₂ HPO₄ 0.2 M) y posteriormente se cuantificó por un método convencional de Bradford. En este estudio la purificación fue exitosa ya que se realizó bajo condiciones desnaturantes, y mostro resultados satisfactorios.

Pero existen nuevas técnicas como el uso de Tags, estas Tags generalmente se unen con el extremo N o C-terminal de una proteína diana, y esto permite que sus proteínas compañeras sean purificadas selectivamente mediante asociación de afinidad específica, o por precipitación selectiva. La Tag

más utilizada en los laboratorios es Polyhistidine, o His-tag ya que es pequeña, de bajo costo y, en general, tiene un efecto mínimo o nulo en la estructura o función de la proteína. Aunque la etiqueta His tiene una desventaja que es que tiene la tendencia de generar residuos contaminantes y la eliminación de estos puede requerir de otros procesos, y de hecho la cepa *Escherichia coli* LOBSTR (Low Background Strain), ha sido recientemente diseñado para eliminar la contaminación más abundante proteínas del huésped.

Para nuestro estudio es recomendable seguir los procedimientos expuestos Rodriguez *et al.*, (2009) ya que obtuvo resultados exitosos, utilizando la misma proteína de nuestro interés.

9.Conclusiones

Se produjo con éxito la PPAD-NT recombinante, aunque de manera insoluble.

10. Referencias bibliográficas

- 1) Armitage CG. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann of periodontol 4, 1-6; 1999.
- 2) Espejo J, Sosa A, Carrascal A, Cifuentes C, Barreto B, Producción de la proteína recombinante humana hsc70 y su aplicación en el desarrollo de un sistema de detección por Elisa. UNIVERSITAS SCIENTIARUM 2004 ; (9) 69-80.
- 3) Fisher B, Cartwright A, Quirke A, De Pablo P, Romaguera D, Panico S, *et al.* Smoking, *Porphyromonas gingivalis* and the immune response to citrullinated autoantigens before the clinical onset of rheumatoid arthritis in a Southern European nested case-control study. BMC Musculoskelet Disord. 2015; 16: 331.
- 4) Gabarrini G, Smit M, Westra J, Brouwer E, Vissink A, Zhou K, *et al.* The peptidylarginine deiminase gene is a conserved feature of *Porphyromonas gingivalis*. Sci Rep. 2015.
- 5) García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Cruz O. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, VacciMonitor 2013;22(2):30-39
- 6) Hernandez Cuéllar M, Hernández Cuéllar I, Hernández R. Correlación etiopatogénica entre periodontitis y artritis reumatoide. Revista Cubana de Reumatología. 2013; 15(1): 30-35.
- 7) Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke A, *et al.*, Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY. 2016 vol. 68, No. 3, pp 604–613 DOI 10.1002/art.39491
- 8) Kobayashi T, Kobayashi D, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Serum Immunoglobulin G Levels to *Porphyromonas gingivalis* Peptidylarginine Deiminase Affect Clinical Response to Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug in Rheumatoid Arthritis. PLoS One. 2016 Apr 25;11(4): e0154182. doi: 10.1371/journal.pone.0154182. eCollection 2016.

- 9) König MF, Paracha AS, Moni M, Bingham CO 3rd, Andrade F. Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Ann Rheum Dis*. 74:2054-2061; 2014.
- 10) Lafaurie G, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Barón A, Hurtado PA. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontology*; 34:873-9. 2007.
- 11) Laugisch O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Venables PJ, Potempa J, Möller B, Eick S. Citrullination in the periodontium-a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Investig*. 2015. DOI 10.1007/s00784-015-15567
- 12) Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*; 12:2-9, 2010.
- 13) Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, Benedyk M, Pyrc K, Quirke AM, Jonsson R, Alzabin S, Venables PJ, Nguyen KA, Mydel P, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS Pathog*. 2013. 9: e100362
- 14) Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya MR. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: Un acercamiento epidemiológico. *Biomédica* 27: 21, 2007
- 15) Montgomery AB, Kopec J, Shrestha L, Thezenas ML, Burgess-Brown NA, Fischer R, Yue WW, Venables PJ. Crystal structure of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015. pii: annrheumdis2015-207656. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207656
- 16) Molano W, Puin S, Munevar J, Lafaurie G, Valle R, Romero M. Papel de la enfermedad periodontal en el desarrollo de entidades inflamatorias de etiología autoinmune: implicaciones clínicas y desafíos terapéuticos. *Rev Colomb. Reumatol*. June 2012; Volume 19(2): 84-91.

- 17) Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, *et al.*, Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. *Ann Rheum Dis*; 73:263-269. 2014.
- 18) Ragghianti MS, Greggi SL, Lauris JR, Santana AC, Passanezi E. Influence of age, sex, plaque and smoking on periodontal conditions in a population from Bauru, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2004 Dec;12(4):273-9.
- 19) Rodríguez SB, Stitt BL, Ash DE. Expression of peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* in *Escherichia coli*: enzyme purification and characterization. *Arch Biochem Biophys*. 488:14–22; 2009.
- 20) Routsias JG, Goules JD, Goules A, Charalampakis G, Pikazis D. Autopathogenic correlation of periodontitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 50:1189-1193; 2011.
- 21) Totaro MC, Cattani P, Ria F, Tolusso B, Gremese E, Fedele AL, D'Onghia S, Marchetti S, Di Sante G, Canestri S, Ferraccioli G. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 15: R66; 2013
- 22) Wingfield P, Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2015 Apr 1; 80:6.1.1-35.