



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO OBSERVACIONAL SOBRE LA
ETIOLOGÍA, PATOGENIA Y VALOR
CLÍNICO DE LOS ANTICUERPOS
ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS
EN LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Cristina Regueiro Expósito

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO OBSERVACIONAL SOBRE LA ETIOLOGÍA, PATOGENIA Y VALOR CLÍNICO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

Dña. Cristina Regueiro Expósito

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 12 de febrero de 2020

Fdo. Cristina Regueiro Expósito





AUTORIZACIÓN DEL LOS DIRECTORES Y TUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO OBSERVACIONAL SOBRE LA ETIOLOGÍA, PATOGENIA Y VALOR CLÍNICO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

D. Antonio González Martínez-Pedrayo
D. Antonio José Mera Varela
Dña. Celia María Pombo Ramos

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Cristina Regueiro Expósito, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 12 de febrero de 2020

Fdo. Antonio González
Martínez-Pedrayo (director)

Fdo. Antonio José
Mera Varela (director)

Fdo. Celia María
Pombo Ramos (tutora)





La autora declara que no tiene ningún conflicto de interés con esta tesis doctoral.





A mi hermana



Agradecimientos

No podría terminar el doctorado sin antes mostrar mi más sincero agradecimiento hacia todas aquellas personas que se han encargado de ponerme este camino más fácil.

En primer lugar, me gustaría comenzar por Lorena. Todavía no soy capaz de encontrar la forma de agradecerte todo lo que has hecho a lo largo de estos años. Entraste en el laboratorio y en poco tiempo te convertiste en algo esencial; y no lo digo solo por tus grandes habilidades como química, sino por tu enorme capacidad para animarme. Siempre has encontrado una manera de hacerme sentirme bien, con tus post-it “sube ánimo”, tus consejos o tu incansable disposición para escucharme. Me has ayudado en todo, en lo laboral y en lo personal, y siempre has conseguido algo bueno. Lo que más me gusta de todo esto es que, volviendo hacia atrás, solo encuentro momentos contigo llenos de risas inexplicables que no cambiaría por nada del mundo. Muchas gracias, Lorena. Te has convertido en una verdadera amiga. Te echaré de menos.

Siguiendo con mis chicas del laboratorio, tengo que nombrar al pilar fundamental de este proyecto, Carmen, nuestra técnico. Nuestra super técnico de laboratorio. Una mano incansable, organizada, capaz de sacar una inmensidad de trabajo por delante. Muchas gracias por toda tu ayuda y por tus consejos, nunca han sido malos. Aunque puedas pensar lo contrario, he aprendido un montón contigo durante todo este tiempo. Está claro que al principio me ha costado, pero poco a poco me he dado cuenta de que tienes una personalidad única. No cambies nunca.

También tú, Ángela, te llevas parte de mi agradecimiento. No sé si es por tu hipocondría, tus conversaciones raras con la super técnico, o por vuestra relación “matrimonio y sus problemas”, pero siempre logras sacar algo divertido. Sin duda la mudanza solo ha traído cosas buenas. Gracias a ti y a Carmen, por vuestro apoyo y vuestras ganas de crear un ambiente agradable en el laboratorio. El Labo 10 ya no sería lo mismo sin vosotras. Me quedas tú, Ángeles, nuestra última novedad. El claro ejemplo de que en poco tiempo se puede ver a una persona como algo más que una simple compañera de laboratorio. Muchas gracias por escucharme y por haberme ofrecido tu apoyo desde el primer día.

A todas y todos los que ya no estáis, pero que también habéis formado parte de este proyecto. Laura, no me hago a la idea de un comienzo sin ti. Gracias por ayudarme a crecer en el laboratorio, por tus consejos y por tu protección. Estos últimos años sin “mamá Laura” no han sido lo mismo. Rosario, otra voz de la experiencia de vital importancia. Muchas gracias por haberme aportado tanto, no hay duda de que contigo al lado avanzar ha sido mucho más fácil. Estos últimos años tampoco han sido lo mismo sin la “chispa” que siempre le has puesto al laboratorio. Nerea, ya te considero una más del Labo 10. Gracias por tu cercanía y por hacer más divertida esta etapa. Está claro que nuestro viaje al EULAR se ha convertido en uno de los mejores momentos de la tesis doctoral. Aida, una de las primeras en formar parte de esta historia, muchas gracias por ayudarme a salir adelante. Rebeca, mi primera “teacher” del labo, gracias por invertir parte de tu tiempo en transmitirme tus conocimientos. También gracias a Manolo por sus brillantes explicaciones sobre bioestadística, a Fran por su compañía, y a Sonia, por la de carcajadas que has conseguido sacarme en poco tiempo.

Antes de salir del Labo 10 tengo que darle las gracias a Antonio, director de esta tesis doctoral. Gracias por darme la posibilidad de formar parte del grupo y por ayudarme a conseguir la financiación necesaria. Gracias también por tu esfuerzo en sacar adelante este proyecto, sin tu implicación la tesis doctoral no habría acabado de esta forma. Muchas gracias por tus consejos, revisiones y, sobre todo, gracias por hacerme creer en una ciencia leal y rigurosa.

Aprovecho también para mostrar mi agradecimiento hacia todo el servicio de Reumatología del hospital de Santiago, así como también hacia el resto de hospitales que han participado en este proyecto. Muchas gracias por vuestra disposición a colaborar y, por supuesto, un millón de gracias a todas y todos los pacientes, sin vuestra ayuda nada de esto sería posible.

Fuera del Labo 10 me gustaría empezar por el grupo de Nefro. Gracias por todos los buenos ratos que hemos compartido, tanto dentro como fuera del laboratorio. Especialmente gracias a ti, Cosman. Gracias por mostrarme tu apoyo, por escucharme siempre y por tu confianza. Ha sido un placer compartir la etapa predoctoral contigo. También tengo que ofrecer mi agradecimiento a las chicas de Cardio. Fue muy agradable compartir el momento de la comida con vosotras. Gracias Sandra, por compartir siempre tu pan, y gracias Alana, por tu confianza, tu apoyo y tu simpático “Cri”. Te llevo como una amiga. Por último, me gustaría destacar a

uno de los integrantes del resto de grupos de Reuma, Eloy. Muchas gracias por tenerme siempre en cuenta y, sobre todo, gracias por aceptar mis ausencias.

No podría dejar el hospital sin darle las gracias a Loló. No solo tengo que agradecerle la colaboración en este proyecto, sino también todo lo que me has ayudado a nivel personal. Gracias por toda la confianza que me has ofrecido, llevo guardadas nuestras conversaciones con mucho cariño.

Alejadas del ambiente laboral están Jeannette y Raquel, dos fieles amigas que nunca han dejado de mostrarme su máximo apoyo. Creo que somos el claro ejemplo de “la amistad es estar separadas sin que nada cambie”. Muchas gracias por aceptarme, sois uno de los mejores regalos que me ha dado el máster.

Otras dos grandes personas de las que siempre estaré enormemente agradecida son Lago y Navedo. Lago, gracias por cada momento que has compartido conmigo, todos han sido increíbles. Me voy más tranquila sabiendo que “Papá está en casa”. Navedo, muchas gracias por tu confianza, por tu disposición para escucharme y mantenerme siempre arriba. Muchas gracias a los dos, os llevaré siempre como buenos amigos.

En general, tengo que dar las gracias a todas aquellas personas que se han encargado de endulzar esta etapa predoctoral. Antiguos compañeros y compañeras de la carrera, del máster y otras nuevas amistades de estos últimos años. Muchas gracias a todos y todas. ¡Nos vemos en los bares!

Y ahora viene la parte más intensa. Toca nombrar al motor principal de este proyecto, mi familia y su amor incondicional. Tengo muy claro que si he llegado hasta aquí ha sido gracias al apoyo de mis padres. Vosotros me lo habéis dado todo, desde la ayuda más básica hasta la principal motivación para seguir adelante. Siempre estaré enormemente agradecida de vuestra confianza, de vuestro esfuerzo en hacerme crecer como persona y de vuestra capacidad para enseñarme a valorar lo que realmente merece la pena. Gracias por vuestras dosis de humor, por la pasión con la que vivís cada uno de mis pequeños triunfos, por vuestro cariño, vuestro respeto y vuestra paciencia. Muchas gracias por encontrar la fórmula correcta para recargarme y mantener mi autoestima en alto. Una tesis doctoral sin vosotros se me habría hecho demasiado cuesta arriba. Gracias de corazón. ¡Yo sí estoy orgullosa de vosotros!

A Ana, mi única y mejor hermana, un millón de gracias por estar siempre ahí. Gracias por tu atención y por tus detalles. Gracias por no dejar de exaltarme nunca y por confiar siempre en mí. Aun con nuestras diferencias, juntas formamos un buen equipo. Me gusta pensar en la de momentos que todavía nos quedan por compartir. “Sempre se” quixo a unha irmá.

También me gustaría nombrar a mis pequeñas minipatas, Lua y Trufa. Gracias por vuestros intensos recibimientos y por enseñarme que no hacen falta palabras para demostrar el verdadero amor.

Al resto de mi familia, muchas gracias por apoyarme y no dejar de valorarme. Tengo mucha suerte de teneros. ¡Familia unida jamás será vencida!

La última parte la guardo para el más especial. Tú has sido la persona que verdaderamente ha estado ahí. Nunca has dejado de valorarme y de recordarme lo bien que pueden salir las cosas. Mi etapa predoctoral se ha llenado de pasión y de alegría gracias a todo tu esfuerzo, y siempre estaré enormemente agradecida del empeño que has puesto para tratar de sacar mi positivismo, mantener mi calma y hacerme sonreír. Tú has sido la persona que ha conseguido transformar la dureza de este camino en algo fascinante. Un millón de gracias. Gracias también por no rendirte nunca, por soportar mis contradicciones, mis altibajos emocionales y mi apatía. Es muy injusto que hayas tenido que ser tú el que se haya llevado la peor parte de todo esto. Si ha sido así es porque te has ganado mi total confianza y porque en ti he conseguido encontrar un aura de protección y bienestar que ninguna otra persona podría darme de la misma forma. No te cambiaría por nada del mundo. Gracias por darme cada fin de semana el mejor motivo para continuar el lunes. Gracias por todo, Víctor. Eres el mejor.

Ha sido un placer compartir todos estos años con vosotros y vosotras.

Muchas gracias.

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, sistémica y autoinmune, que presenta una prevalencia del 0.5 - 1 % a nivel mundial. Es una enfermedad que puede ocasionar destrucción articular, y que se asocia con discapacidad, deterioro de la calidad de vida y aumento de la mortalidad. Un 80 % de los pacientes con AR presenta autoanticuerpos específicos, en su mayoría factor reumatoide (FR) que reconoce la fracción constante de la inmunoglobulina G, y anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA) que reconocen proteínas que han sufrido un proceso de modificación postraducciona conocido como citrulinación. El FR o los ACPA definen al grupo de pacientes con AR seropositivos y son utilizados en la práctica clínica como biomarcadores de la enfermedad. Son anticuerpos que se encuentran años antes del inicio de la clínica, y su utilidad en el diagnóstico de la AR se ha demostrado sobre todo en el contexto de las clínicas de artritis de reciente comienzo (EA). La importancia del FR y los ACPA como biomarcadores diagnósticos está reflejada en la introducción de ambos anticuerpos en los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010, utilizados actualmente para clasificar a los pacientes con AR. El papel patogénico de estos anticuerpos también se ha demostrado por sus asociaciones con una enfermedad más grave y con un mayor daño radiológico. Además, el FR y los ACPA se asocian con algunos de los factores etiológicos genéticos y ambientales que aumentan el riesgo de AR. Así, estos anticuerpos se han relacionado con alelos de riesgo de la molécula HLA-DRB1 y con el tabaquismo.

Los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-CarP) también son autoanticuerpos específicos de la AR que reconocen proteínas que han sido modificadas postraduccionalmente mediante un proceso conocido como carbamilación. Se describieron por primera vez en el año 2011, y a pesar de no ser utilizados en la clínica, son anticuerpos que tienen un papel importante en la enfermedad. Los antígenos carbamilados reconocidos por estos anticuerpos en los pacientes con AR no se conocen, y por este motivo su identificación se realiza normalmente utilizando un ELISA con suero bovino fetal (FBS) carbamilado *in vitro* como antígeno. Los anticuerpos anti-CarP están en el 30-40 % de los pacientes, y participan en la patogenia de la AR. El papel patogénico de estos anticuerpos está justificado por su presencia antes del inicio de la clínica, por sus asociaciones con las erosiones y la mayor progresión

radiológica de los pacientes, y por su relación con la mortalidad. Todo esto sumado a la asociación entre estos anticuerpos y la mayor actividad de la enfermedad, justifica la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores pronósticos de la AR. El valor diagnóstico de los anticuerpos anti-CarP es inferior al de los ACPA y el FR, pero todavía no está claro si pueden contribuir a la clasificación de los pacientes. Por otra parte, los anticuerpos anti-CarP no se asocian ni con los alelos de riesgo de la molécula HLA-DRB1 relacionados con los ACPA y el FR, ni con el tabaquismo. Sin embargo, todavía no se han identificado los factores de riesgo genéticos y ambientales que predisponen a la formación de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con AR.

En este proyecto hemos abordado algunas cuestiones todavía no resueltas para definir mejor el papel que tienen los anticuerpos anti-CarP en la AR. Para ello hemos realizado un estudio observacional transversal utilizando 1607 pacientes con AR procedentes de distintos hospitales españoles. A mayores, hemos realizado estudios longitudinales utilizando 1062 pacientes con EA procedentes de dos cohortes de hospitales españoles que recibieron un seguimiento durante dos años. Además, en los experimentos de este proyecto hemos incluido los datos disponibles de 3899 pacientes con AR procedentes de varias colecciones europeas. En los pacientes con AR hemos encontrado una asociación entre los anticuerpos anti-CarP y el alelo *03 de la molécula HLA-DRB1. Esta relación entre los anticuerpos anti-CarP y el HLA permite definir parte de la etiología de estos anticuerpos, que hasta el momento no era conocida. A pesar de la falta de relación entre los anticuerpos anti-CarP y el tabaquismo, en los pacientes con AR hemos encontrado que el tabaco se asocia con la presencia concordante de los anticuerpos anti-CarP, los ACPA y el FR. De esta forma, a través de la triple seropositividad hemos identificado un factor de riesgo ambiental relacionado con los anticuerpos anti-CarP, contribuyendo de nuevo a definir la etiología desconocida de estos anticuerpos. También hemos analizado la utilidad de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de los pacientes con AR. Este análisis lo hemos realizado en los pacientes con EA, confirmando que los anticuerpos anti-CarP tienen un valor inferior al del FR y los ACPA en la clasificación. Además, su inclusión en los criterios ACR/EULAR 2010 tampoco mejora la clasificación de los pacientes. Por el contrario, hemos visto que la presencia concordante de los tres autoanticuerpos sí es una característica que consigue mejorar la clasificación, presentando la posibilidad de considerar a la triple positividad en los criterios. En los pacientes con EA también hemos analizado la utilidad de los anticuerpos anti-CarP como

biomarcadores pronósticos de la enfermedad. Nuestros resultados muestran que los anticuerpos anti-CarP se asocian con una mayor actividad de la enfermedad y una mayor incapacidad funcional de los pacientes. Además, estas asociaciones fueron más marcadas en aquellos pacientes que habían comenzado con artritis más jóvenes y mostraron un efecto independiente al resto de autoanticuerpos. Por último, también encontramos una asociación entre los anticuerpos anti-CarP y la disminución de la densidad mineral ósea de los pacientes con EA. Esta es la primera evidencia que relaciona a los anticuerpos anti-CarP con este tipo de lesiones óseas, contribuyendo a definir el papel patogénico que tienen estos anticuerpos en la enfermedad. En conjunto, los resultados de nuestro proyecto mejoran la caracterización de los anticuerpos anti-CarP en la AR, tanto en relación a su etiología y patogenia, como a su utilidad como biomarcadores de la enfermedad.





ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS.	5
1.1 Carbamilación de proteínas.	5
1.2 Respuesta autoinmune frente a proteínas carbamiladas.	7
1.3 Método de identificación de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.	8
2. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS.	9
2.1 Anticuerpos anti-proteínas carbamiladas en la artritis reumatoide.	9
2.1.1 Características de estos anticuerpos en la enfermedad: isotipos y subclases.	9
2.1.2 Relación de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas con otros autoanticuerpos.	12
2.1.3 Factores etiológicos genéticos y ambientales que se han estudiado.	15
2.1.4 Papel patogénico de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.	20
2.1.5 Implicaciones clínicas de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.	29
2.1.6 Posibles antígenos carbamilados.	40
2.1.7 Carbamilación de proteínas en la artritis reumatoide.	43
2.2 Anticuerpos anti-proteínas carbamiladas en otras enfermedades.	45
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. Pacientes y controles.	55
1.1 Muestras de pacientes con EA: IDIPAZ y PEARL.	55
1.2 Muestras de pacientes con AR establecida: IDIS, IDIVAL e IdISSC.	56
1.3 Muestras de controles.	57
1.4 Cohortes EIRA, EAC Leiden, BARFOT, NOAR y Rome.	57
2. Consideraciones éticas.	60
3. Preparación del antígeno carbamilado.	60
4. Confirmación de la carbamilación del FBS por cromatografía líquida de alta resolución.	60
4.1 Hidrólisis de proteínas.	60

4.2 Análisis de aminoácidos por HPLC.....	61
5. Cuantificación de los anticuerpos anti-CarP en suero.....	63
6. Determinación de los ACPA y el FR en suero.....	64
7. Evaluación de la DMO.....	64
8. Tipaje del locus <i>HLA-DRB1</i>	65
9. Análisis estadístico.....	67
9.1 Estadística descriptiva.....	67
9.2 Análisis de correlación y concordancia.....	68
9.3 Evaluación de las pruebas diagnósticas.....	68
9.4 Árboles de clasificación.....	69
9.5 Evaluación de la calidad de los modelos.....	71
9.6 Análisis multivariantes.....	71
9.6.1 Regresión logística.....	71
9.6.2 Regresión lineal.....	72
9.7 Combinación de cohortes: meta-análisis.....	73
RESULTADOS.....	79
CAPÍTULO 1. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con el alelo <i>HLA-DRB1*03</i> en los pacientes con AR.....	79
1.1. Prevalencia de autoanticuerpos en los pacientes con AR incluidos.....	81
1.2. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con los alelos de <i>HLA-DRB1</i>	82
1.3. Análisis detallado de la relación entre los anticuerpos anti-CarP y el alelo <i>HLA-DRB1*03</i>	86
CAPÍTULO 2. Relación del tabaquismo con la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes con AR.....	91
2.1. Replicación de la asociación del tabaquismo con la presencia concordante de tres autoanticuerpos.....	93
2.2. Asociación entre el tabaquismo y la presencia concordante de autoanticuerpos combinando todos los datos disponibles.....	95
2.3. Asociación del tabaquismo con la presencia del FR en los pacientes con uno o dos autoanticuerpos.....	97
2.4. Análisis exploratorio en todos los pacientes.....	99
CAPÍTULO 3. Valor predictivo de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con EA, y su contribución en la clasificación de los pacientes con AR.....	101

3.1 Prevalencia de autoanticuerpos y características de los pacientes incluidos.	103
3.2. Valor diagnóstico de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con EA.....	105
3.3. Contribución de los anticuerpos anti-CarP a la clasificación de los pacientes con AR.....	108
3.4. Contribución de la presencia concordante de autoanticuerpos a la clasificación de los pacientes con AR.	110
CAPÍTULO 4. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad de la enfermedad y una peor capacidad funcional con predominio en los pacientes más jóvenes.	115
4.1 Mayor actividad de la AR y mayor incapacidad funcional en los pacientes con EA que son anti-CarP positivos.....	117
4.2 Mayor actividad de la enfermedad en los pacientes anti-CarP positivos que habían comenzado con artritis más jóvenes.....	118
4.3 Mayor incapacidad funcional en los pacientes anti-CarP positivos de menor edad.	123
4.4 Los pacientes anti-CarP positivos mostraron una peor evolución de manera independiente a la edad.....	125
CAPÍTULO 5. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con la disminución de la DMO en los pacientes con EA.....	129
5.1. Características de los pacientes incluidos.	131
5.2. Los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de la DMO.	132
5.3. Asociación de la pérdida de DMO con los anticuerpos anti-CarP con independencia de los ACPA.	134
DISCUSIÓN.....	139
1. Asociación específica del <i>HLA-DRB1*03</i> con la presencia de anticuerpos anti-CarP en pacientes con AR.	141
2. El tabaquismo se asocia predominantemente con la AR que presenta de forma concordante varios autoanticuerpos: controversia con los modelos patogénicos actuales.....	145
3. Valor de los anticuerpos anti-CarP para la clasificación como AR de los pacientes con EA.	150
4. Los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores de mayor actividad e incapacidad funcional de los pacientes con EA.....	154
5. Asociación independiente de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida ósea a nivel sistémico.	157

CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167
ANEXOS.....	183



ABREVIATURAS

A1AT	alfa-1-antitripsina
ACPA	anticuerpos anti-proteínas citrulinadas
ACR	colegio americano de reumatología
AI	artritis indiferenciada
AIJ	artritis idiopática juvenil
Anti-CarP	anticuerpos anti-proteínas carbamiladas
AP	antipalúdicos
APC	células presentadoras de antígenos
APLAR	liga de asociaciones de reumatología del Asia-Pacífico
AR	artritis reumatoide
AUC	área bajo la curva
BARFOT	<i>better anti-rheumatic farmaco-therapy</i>
BCR	receptor de linfocitos B
CaFBS	suero bovino fetal carbamilado
CART	árboles de regresión y clasificación
CaT	cadera total
Ccd.	concordancia
CCP	péptidos cíclicos citrulinados
CEIC	comité ético de investigación clínica
CoL	columna lumbar
DAS28	índice de actividad de la enfermedad
DEXA	absorciometría con rayos X de energía dual
DMO	densidad mineral ósea
DS	desviación estandar
EA	artritis de reciente comienzo
EC	epítipo compartido
EIRA	<i>epidemiological investigation of rheumatoid arthritis</i>
EM	esclerosis múltiple
EULAR	liga europea contra el reumatismo
FAMEs	fármacos modificadores de la enfermedad
FBS	suero bovino fetal
FcγR	receptor Fc gamma
FR	factor reumatoide
GC	glucocorticoides
GRP78	proteína reguladora de glucosa 78
HAQ	cuestionario de evaluación de salud
HLA	antígeno leucocitario humano

ABREVIATURAS

HLA-DRB1	cadena beta 1 de la molécula HLA-DR
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Hsp70	proteína de choque térmico 70
IC 95 %	intervalo de confianza del 95 %
IgG	inmunoglobulina G
IMC	índice de masa corporal
IQR	rango intercuartílico
LEF	leflunomida
Leiden EAC	<i>Leiden early arthritis cohort</i>
LES	lupus eritematoso sistémico
MCF	articulación metacarpofalángica
MPO	mieloperoxidasa
MS	espectrometría de masas
MTX	metotrexato
NET	trampas extracelulares de neutrófilos
NOAR	<i>Norfolk arthritis register</i>
OEA	otras artritis de reciente comienzo
PAD	peptidil arginina deiminasa
PCR	proteína C reactiva
PEARL	registro de artritis temprana del hospital universitario La Princesa
ROC	curva operativa del receptor
RV-	razón de verosimilitud negativa
RV+	razón de verosimilitud positiva
SS	síndrome de Sjögren
SSOP	sondas de oligonucleótidos de secuencia específica
SZL	sulfasalacina
TCR	receptor de linfocitos T
UA	unidades arbitrarias
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo
VSG	velocidad de sedimentación globular



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS.

1.1 Carbamilación de proteínas.

Los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-CarP) son aquellos que reconocen proteínas que han sufrido un proceso de modificación postraducciona conocido como carbamilación¹. La carbamilación de proteínas es un tipo de modificación que ocurre de forma no enzimática y siempre en presencia de cianato². El cianato reacciona preferentemente con los grupos ϵ -amino de las lisinas, generando un compuesto que se conoce como ϵ -carbamil-lisina u homocitrulina² (Figura 1). Esta preferencia hace que la carbamilación de proteínas se refiera principalmente a la conversión de lisinas por homocitrulinas, a pesar de que el cianato también puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las cisteínas³, y con los grupos amino de los residuos de arginina y de los extremos N-terminales⁴.

El cianato es un compuesto inorgánico presente en el organismo a una concentración baja (45 nmol/L)². Sin embargo, determinadas situaciones pueden incrementar los niveles de este metabolito. La concentración de urea es la principal reguladora de los niveles de cianato, ya que bajo condiciones fisiológicas ambos compuestos se encuentran en equilibrio². De esta forma, incrementos en los niveles de urea llevan a incrementar los niveles de cianato y, en consecuencia la carbamilación de proteínas^{2,4} (Figura 1). Los pacientes con síndrome renal crónico son un claro ejemplo de esta situación, cuyo suero se caracteriza por mostrar una elevación de los niveles de proteínas carbamiladas⁵. Además de la urea, la enzima mieloperoxidasa (MPO) también puede favorecer la carbamilación proteica indirectamente a partir de la formación de cianato⁶. La MPO utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar al tiocinato, lo que da lugar a la formación de ácido hipotiocianítico y cianato². En este caso, es el incremento en la concentración de tiocinato el responsable de promover la reacción de carbamilación. El tipo de dieta y el tabaco son los principales determinantes de los niveles de tiocinato en plasma^{2,7}. De hecho, los niveles de tiocinato elevados en los pacientes fumadores han permitido explicar la evidente relación entre la carbamilación de proteínas y el tabaquismo⁶. A la MPO no solo se le ha atribuido la responsabilidad de incrementar la

carbamilación de proteínas en los pacientes fumadores, sino que también se ha relacionado con la elevación de la carbamilación en la respuesta inflamatoria y en la aterosclerosis. La MPO es una de las principales proteínas expresadas en neutrófilos y macrófagos⁸. La secreción de la MPO por parte de los neutrófilos en respuesta a procesos inflamatorios se ha utilizado para explicar el incremento de proteínas carbamiladas durante la inflamación^{6,7} (Figura 1). En el caso de la aterosclerosis, la carbamilación de proteínas se ha vinculado a la actividad de la MPO expresada en los macrófagos del epitelio vascular^{2,6,9,10}. Algunas de estas proteínas carbamiladas, y especialmente las lipoproteínas, muestran un papel clave en el desarrollo de las placas ateroscleróticas^{9,10}.

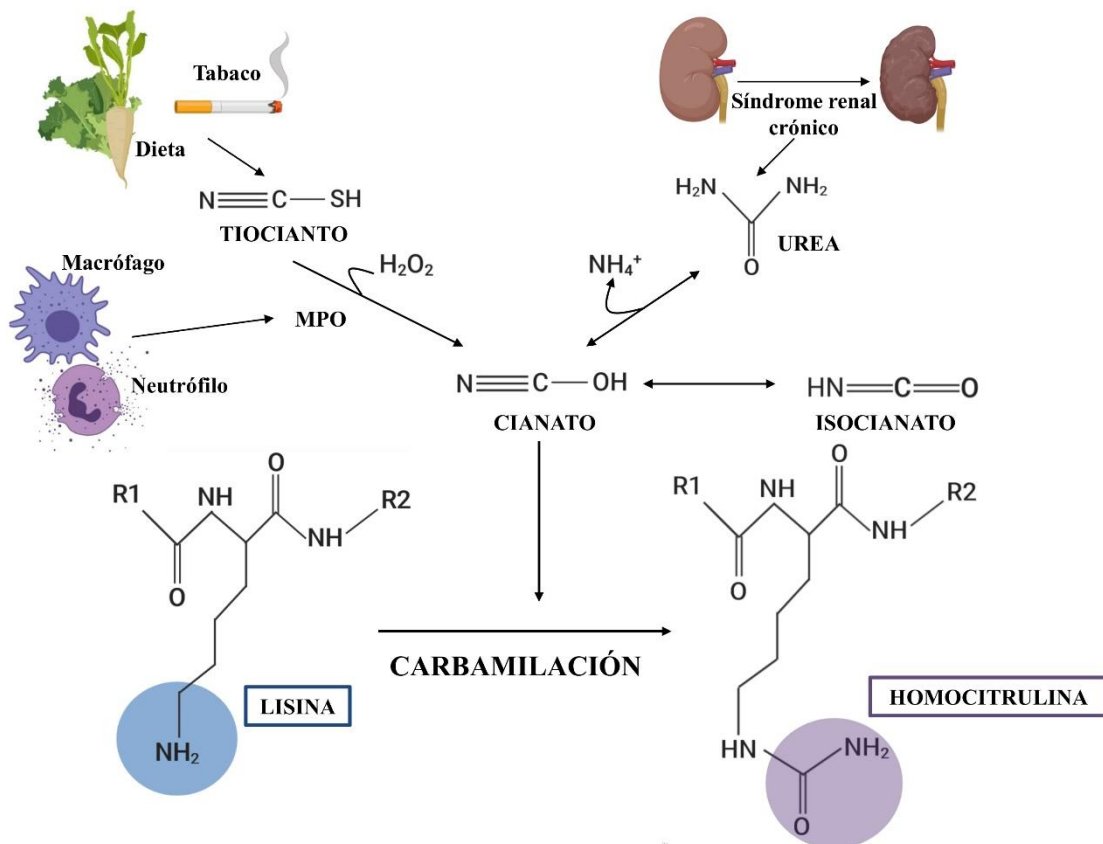


Figura 1. Carbamilación de proteínas. Ilustración esquemática de la reacción de carbamilación, y de las distintas vías que pueden promover la carbamilación de proteínas. Imagen de autoría propia.

La uremia, el tabaquismo, la inflamación y la aterosclerosis son las cuatro situaciones principales que se asocian con aumento de la carbamilación de proteínas. Sin embargo, la reacción de carbamilación también ocurre bajo condiciones fisiológicas a un nivel que, aun siendo menor, puede conducir a la acumulación de proteínas carbamiladas en el organismo². En este caso es importante tener en cuenta la vida media de las proteínas, ya que aquellas

proteínas con una vida media larga estarán más expuestas a la carbamilación². La acumulación de proteínas carbamiladas a lo largo del tiempo permite explicar los niveles elevados de carbamilación en los tejidos envejecidos. De esta forma, la carbamilación de proteínas se ha relacionado con el envejecimiento¹¹; y no solo con el envejecimiento en sí mismo, sino que también se ha asociado con algunas enfermedades vinculadas a este proceso, como podría ser el desarrollo de cataratas en las personas de edad avanzada².

1.2 Respuesta autoinmune frente a proteínas carbamiladas.

Los cambios postraduccionales introducidos en las proteínas pueden ser reconocidos por el sistema inmune como extraños. Así, las proteínas modificadas podrían iniciar una respuesta inmune que desembocase en la aparición de una enfermedad autoinmunitaria¹²⁻¹⁵. La esclerosis múltiple (EM)¹⁶, el lupus eritematoso sistémico (LES)¹⁷, la diabetes mellitus¹⁸ o la artritis reumatoide (AR)¹⁹, son ejemplos de enfermedades autoinmunes que presentan autoanticuerpos frente a proteínas modificadas postraduccionales.

El sistema inmune desarrolla tolerancia inmunológica a partir de la eliminación de los linfocitos T autoreactivos en el timo. En este lugar, las células presentadoras de antígenos (APC) procesan y presentan a las proteínas endógenas del organismo. Aquellos linfocitos capaces de reconocer a estas proteínas son seleccionados negativamente y eliminados para evitar su presencia en la periferia²⁰. Los mecanismos que utilizan los linfocitos T autoreactivos frente a proteínas modificadas postraduccionales para escapar de esta tolerancia inmunológica no están bien definidos. Es posible que algunas de las modificaciones no sean presentadas en el timo y, en consecuencia, los linfocitos T autoreactivos no serían eliminados y saldrían a la circulación periférica^{12,21,22}. En los tejidos, las proteínas modificadas postraduccionales podrían ser presentadas por las APC a estos linfocitos T que no han sido eliminados, iniciando una respuesta inmune que incluye la producción de autoanticuerpos específicos frente a estas modificaciones^{12,21}. Sin embargo, es importante tener en cuenta que todos tenemos proteínas modificadas postraduccionales y que por lo tanto la simple presencia de estas proteínas no puede ser suficiente para que se produzca una reacción inmune frente a ellas.

Teniendo esto en cuenta, es comprensible que la carbamilación pueda introducir cambios en las proteínas capaces de iniciar una respuesta autoinmune en condiciones favorables e

individuos predispuestos². En el año 2010 se demostró por primera vez la autoinmunidad frente a proteínas carbamiladas en los trabajos publicados por *Turunen S y col.* y *Mydel P y col.*^{23,24}. Los primeros autores encontraron anticuerpos anti-CarP en el suero de conejos inmunizados con albúmina y colágeno carbamilados²³. En el otro estudio, se identificó activación de linfocitos T y desarrollo de anticuerpos anti-CarP en ratones inmunizados con péptidos carbamilados²⁴. Además, algo importante del trabajo de *Mydel P y col.*, fue que la inyección intra-articular de los péptidos carbamilados en las rodillas de los ratones desencadenó el desarrollo de artritis con erosión ósea²⁴. Esto último, junto con la presencia de proteínas carbamiladas en el fluido sinovial de los pacientes con AR²⁴, llevó a estudiar la presencia de estos anticuerpos en el suero de los pacientes con la enfermedad, siendo identificados por primera vez en el año 2011¹. A partir de ese momento, comenzaron a aparecer más trabajos que confirmaron la presencia de los anticuerpos anti-CarP en el suero de los pacientes con AR^{1,25-29} y, en menor medida, en el suero de los pacientes con otras enfermedades reumáticas^{28,30-36}.

1.3 Método de identificación de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.

La primera identificación de estos anticuerpos en el año 2011 se realizó utilizando un ELISA indirecto con suero bovino fetal (FBS) carbamilado *in vitro* como fuente de antígeno¹. El desconocimiento sobre los antígenos carbamilados específicos reconocidos por estos anticuerpos obligó a utilizar un ELISA casero de este tipo. El FBS se seleccionó por ser una muestra compleja de proteínas susceptible de ser fácilmente carbamilada¹. Otros trabajos utilizaron como antígeno algunas proteínas concretas que fueron carbamiladas *in vitro*; como el fibrinógeno²⁵, la vimentina³⁷ o la alfa-enolasa³⁸. Actualmente, se sigue sin conocer los antígenos carbamilados que son reconocidos *in vivo* por estos anticuerpos y, por este motivo, en la mayor parte de los trabajos se continúa utilizando como método de identificación el ELISA casero con FBS carbamilado *in vitro*^{26-30,39,40}. El uso de esta mezcla de proteínas de origen bovino hace que el método de identificación no refleje la situación real *in vivo*, y justifica la necesidad de identificar los antígenos específicos para desarrollar un ensayo más representativo⁴¹.

2. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS.

2.1 Anticuerpos anti-proteínas carbamiladas en la artritis reumatoide.

2.1.1 Características de estos anticuerpos en la enfermedad: isotipos y subclases.

La AR es una enfermedad inflamatoria, crónica de naturaleza autoinmune, que presenta una prevalencia del 0.5 – 1 % a nivel mundial⁴². Los pacientes con AR presentan dolor e inflamación en las articulaciones, principalmente de las manos, los pies, muñecas, tobillos, codos, hombros, rodilla y cadera⁴³. Es una enfermedad que puede ocasionar destrucción articular, y que se asocia con discapacidad, deterioro de la calidad de vida y aumento de la mortalidad⁴³. Además, al ser una enfermedad sistémica, también puede llevar a la aparición de síntomas extra-articulares en los ojos, el pulmón, el corazón u otros órganos⁴⁴. La AR es una enfermedad más común en mujeres, en una proporción 3:1 y frecuentemente se inicia entre los 40 y 60 años aunque puede iniciarse a cualquier edad⁴⁵. Además del sexo y la edad, hay una serie de factores genéticos⁴⁶ y ambientales⁴⁴ que modifican el riesgo de desarrollar la AR, y que serán comentados en los siguientes apartados de este proyecto.

Una fracción importante de los pacientes con AR presenta autoanticuerpos específicos. Dentro de estos, destacan el factor reumatoide (FR), que reconoce la región constante de la inmunoglobulina G (IgG), y los anticuerpos que reconocen proteínas modificadas postraduccionalmente⁴⁷. Los mejor caracterizados entre los últimos son los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA), que reconocen proteínas que han sufrido un proceso de modificación conocido como citrulinación⁴⁸. El FR o los ACPA se encuentran en el 80 % de los pacientes con AR, y son utilizados en la práctica clínica como biomarcadores pronósticos y diagnósticos de la enfermedad⁴⁹. La presencia de cualquiera de estos anticuerpos permite definir al grupo de pacientes seropositivos. No obstante, a pesar de la elevada concordancia entre los dos tipos de anticuerpos, la presencia de los ACPA es más discriminante que la presencia del FR. Así, los ACPA muestran una mayor especificidad, además de presentar un papel en la patogenia y etiología de la AR mucho más definido⁵⁰. El 20 % restante de los pacientes no presenta ninguno de estos autoanticuerpos, y forma lo que se conoce como el grupo de pacientes seronegativos⁵¹. A diferencia de los seropositivos, los pacientes

seronegativos presentan una evolución de la enfermedad y patogénesis mucho menos definida⁵¹.

Los anticuerpos anti-CarP no se utilizan en la práctica clínica, aunque sí son característicos de la AR. Se encontraron por primera vez en una cohorte de pacientes holandeses¹ y, posteriormente, se han ido identificando en otras cohortes de pacientes con AR, tanto europeas como no europeas (Tabla 1).

Tabla 1. Presencia de los anticuerpos anti-CarP en distintas cohortes de pacientes con AR. En la tabla se muestra el autor del trabajo, el año de la publicación, el número total de pacientes utilizado, el origen de la cohorte y el porcentaje de pacientes positivos para los anticuerpos anti-CarP. En todos estos trabajos se identificó el isotipo IgG utilizando un ELISA indirecto con FBS o fibrinógeno (*) carbamylado *in vitro* como antígeno.

Autor	Años	N	Origen	% Positivos	Ref.
<i>Shi J y col.</i>	2011	571	Holanda	44.9	1
<i>Jiang X y col.</i>	2013	1985	Suecia	35.6	52
<i>Verhuel MK y col.</i>	2015	268	Japón	45.2	39
<i>Scinocca M y col.*</i>	2015	84	Canadá	48.8	53
<i>Brink M y col.</i>	2015	192	Suecia	42.2	27
<i>Montes y col.</i>	2016	520	España	29.4	26
<i>Koppejan H y col.</i>	2016	95	Canadá	45.3	40
<i>Pecani A y col.</i>	2016	309	Italia	34.4	30
<i>Challener GJ y col.</i>	2016	212	EEUU	38.2	29
<i>Ajeganova S y col.</i>	2016	576	Suecia	36.3	54
<i>van Wesemael TJ y col.</i>	2016	678	Reino Unido	26.8	55
<i>Nakabo S y col.</i>	2017	265	Japón	46.8	28

Los anticuerpos anti-CarP son específicos de la AR y están presentes en el 30-40 % de los pacientes⁵⁶ (Tabla 1). En la mayor parte de los trabajos se ha estudiado el isotipo IgG, por ser el isotipo de inmunoglobulinas más frecuente en la sangre y los fluidos extracelulares en este tipo de respuestas inmunes⁵⁷. Aun así, en el suero de los pacientes con AR también se han encontrado anticuerpos anti-CarP de isotipo IgA e IgM. La distribución de los distintos isotipos de los anticuerpos anti-CarP fue estudiada por *Van Delft MAM y col.* en el suero de

una cohorte de pacientes con AR⁵⁸. Encontraron que el 16.4 % de los pacientes eran positivos para los anticuerpos anti-CarP de isotipo IgM, mientras que los anticuerpos de isotipo IgG e IgA estaban presentes en un porcentaje más alto, del 49.2 y 40.8 % respectivamente⁵⁸. El isotipo IgM es característico de la respuesta inmune primaria, es decir, de aquella producida tras el primer contacto con el antígeno⁵⁹. Así, la presencia de anticuerpos anti-CarP de este isotipo podría indicar una reactivación constante de la respuesta autoinmune⁵⁸. Por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-CarP de isotipo IgA podría relacionar a estos anticuerpos con las mucosas, por ser el isotipo de inmunoglobulina característico de este tejido⁵⁹. Además del isotipo IgA, otro estudio, encontró al isotipo IgM como el isotipo de inmunoglobulinas unido al componente secretor más abundante en el suero, tanto entre los anti-CarP como en los otros autoanticuerpos específicos de la AR. Algo que se interpretó como indicativo de una reactivación constante de la respuesta autoinmune en las mucosas⁶⁰. Estas interpretaciones son acordes con las hipótesis que sitúan el origen de la autoinmunidad de la AR a nivel de las mucosas⁶¹, y que incluyen la influencia del microbioma en el desarrollo de la enfermedad⁶². Sin embargo, estos resultados se deben interpretar con prudencia porque el isotipo más frecuente es el IgG. Además, aunque el componente secretor queda unido a las inmunoglobulinas después de haber sido transportadas a través de las mucosas, no se conocen ni el mecanismo por el que la IgM unida al componente secretor está presente en el suero, ni si ese mecanismo es equivalente para los distintos isotipos de las inmunoglobulinas.

La distribución de las distintas subclases del isotipo IgG de los anticuerpos anti-CarP también se estudió en el trabajo publicado por *Van Delft MAM y col.*⁵⁸. La subclase más frecuente fue la IgG1, con un porcentaje de pacientes positivos del 50.7 %⁵⁸. Las subclases IgG2 e IgG4 fueron las siguientes más frecuentes, con una reactividad del 27.1 y 27.3 % respectivamente⁵⁸. La IgG3 fue la menos abundante, con solo un 8.0 % de pacientes positivos⁵⁸.

Los trabajos sobre la distribución en el suero de los anticuerpos anti-CarP muestran que estos autoanticuerpos se caracterizan por estar presentes en un amplio rango de isotipos y subclases. Esta es la mejor evidencia disponible de la maduración de la respuesta de estos anticuerpos ya que no se han secuenciado las regiones variables de los anticuepros anti-CarP y no se ha observado aumento de la avidéz por el antígeno desde las primeras muestras positivas a otras muestras obtenidas con posterioridad⁶³. Por el contrario, ya se han

secuenciado las regiones variables de los ACPA y se ha visto que muestran signos de hipermutación somática y de expansión clonal^{64,65}, aunque como con los anticuerpos anti-CarP no se ha encontrado un aumento de avidéz por el antígeno entre las primeras determinaciones positivas y las subsecuentes⁶⁶. Quizás esta falta de evidencia de maduración de la avidéz esté relacionada con la baja avidéz que muestran tanto los ACPA como los anticuerpos anti-CarP por sus respectivos antígenos^{63,66}. Esta avidéz es menor que la de los antígenos de inmunización convencionales, pero este hallazgo se debe interpretar con cuidado pues los experimentos publicados no utilizan técnicas muy exactas, sino que están basados en la disminución de la absorbancia en ELISA por la adición de un agente caotrópico^{63,66}. Esta metodología es mucho menos sofisticada que la resonancia plasmónica de superficie (tecnología Biacore), la titulación calorimétrica isotérmica o la polarización de fluorescencia⁶⁷. Además, un factor adicional de cautela en la determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-CarP es que el agente caotrópico usado fue 1 molar de tiocianato sódico, que es un reactivo empleado en la carbamilación de proteínas.

2.1.2 Relación de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas con otros autoanticuerpos.

Relación con los anticuerpos frente a otras modificaciones postraduccionales.

La carbamilación, la citrulinación y la acetilación de proteínas son las principales modificaciones postraduccionales capaces de generar autoantígenos en la AR¹⁹.

La reactividad frente a proteínas citrulinadas ha sido la más ampliamente estudiada en la enfermedad. La detección de los ACPA se realiza normalmente utilizando un ELISA que incluye como antígeno una mezcla de péptidos cíclicos citrulinados (CCP), y que presenta una sensibilidad del 71-76 % y una especificidad del 88-90 % para el diagnóstico de la AR⁶⁸. A diferencia de la carbamilación, la citrulinación es una reacción enzimática que implica la conversión del aminoácido arginina por citrulina⁶⁹ y que está catalizada por las enzimas peptidil arginina deiminadas (PAD). La estructura de la citrulina es muy similar a la de la homocitrulina, de hecho, únicamente se diferencian en que esta última presenta un grupo metilo adicional⁷⁰ (Figura 2). La similitud de ambas estructuras ha llevado a pensar en la posible reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-CarP y los ACPA. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito un cierto nivel de reactividad cruzada entre ambos anticuerpos^{1,25,71,72},

los ACPA y los anticuerpos anti-CarP forman dos familias distintas, capaces de discriminar entre los antígenos citrulinados o carbamilados, respectivamente. Son varias las evidencias que apoyan esta independencia. Por un lado, existe un 10-20 % de pacientes ACPA negativos que son positivos para los anticuerpos anti-CarP, y un 25-35 % que son positivos para los ACPA pero no para los anti-CarP^{1,26,27}. Por otro lado, la distribución de isotipos y subclases es distinta entre ambos anticuerpos⁵⁸, y los anticuerpos anti-CarP no se asocian con los factores de riesgo típicos de la enfermedad ACPA positiva^{26,73}. Además, existen diferencias en la extensión de la reactividad cruzada detectada en distintos estudios. Es posible que una parte significativa de estas diferencias sea atribuible a factores metodológicos^{74,75}. Entre otras razones para esta atribución está que la reactividad cruzada parece más marcada en estudios que han utilizado arrays de péptidos⁷⁶ y otros antígenos^{25,71}, que en los que han usado FBS carbamilado^{1,72}.

La acetilación es otra modificación enzimática que introduce grupos acetilo en las lisinas de las proteínas. Además, la reducción de la lisina acetilada da lugar a otro aminoácido modificado conocido como ornitina acetilada. La estructura de la lisina acetilada también es similar a la de la homocitrulina⁷⁷. En este caso, el grupo amino terminal de la homocitrulina es sustituido por el grupo acetilo (Figura 2). La inmunogenicidad de las proteínas acetiladas ha empezado a tener relevancia en la AR desde hace unos años. Sin embargo, es importante tener en cuenta que hasta el momento la acetilación de proteínas como tal no se ha estudiado en la enfermedad. Lo que se ha estudiado es la reactividad frente a péptidos artificiales a los que se les ha añadido una lisina u ornitina acetiladas mediante síntesis química. Este carácter artificial es aún mayor al tener en cuenta que la ornitina no es uno de los aminoácidos propios de las proteínas, ni siquiera después de las modificaciones. Aun así, los anticuerpos anti-lisina o anti-ornitina acetiladas se han descrito como nuevos autoanticuerpos específicos de la AR, presentes en el 40 y 50 % de los pacientes, respectivamente^{77,78}. Debido a la similitud entre ambas modificaciones, también se ha estudiado la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CarP y los anticuerpos anti-lisina acetiladas. Sin embargo, la reactividad cruzada es baja, incluso menor que la observada entre los anticuerpos anti-CarP y los ACPA en algunos trabajos⁷⁷. Algo que también apoya la definición de los anticuerpos anti-CarP como un sistema independiente de autoanticuerpos en la AR.

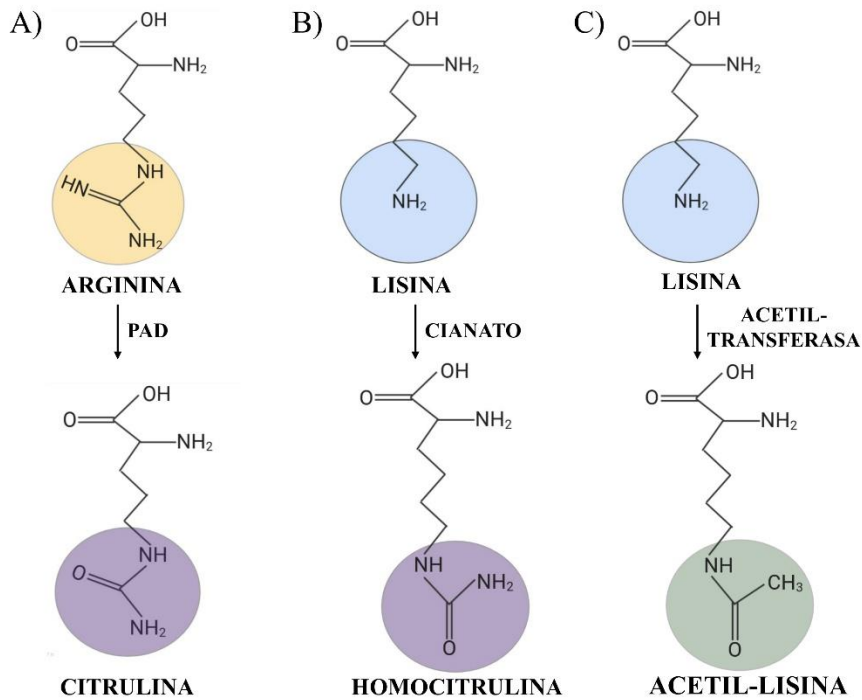


Figura 2. Modificaciones postraduccionales en la AR. A. Citrulinación, B. Carbamilación y C. Acetilación. Se indica con un círculo los grupos modificados en cada uno de los aminoácidos. Imagen de autoría propia.

Relación con el factor reumatoide.

El FR es un autoanticuerpo que reconoce la fracción constante de las IgG, mayoritariamente es de clase IgM, y por lo general se detecta de manera estandarizada por nefelometría⁷⁹. La diferencia en la especificidad antigénica de los anticuerpos anti-CarP y el FR ha hecho que la relación entre los dos anticuerpos no haya sido tan estudiada. Además, como se ha explicado antes, a pesar de ser utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico de la AR, el FR en muchos trabajos ha pasado a un segundo plano respecto a los ACPA⁵⁰. Aun así, se sabe que los anticuerpos anti-CarP y el FR tienden a coexistir, mostrando una concordancia significativa similar a la presentada por los anticuerpos anti-CarP y los ACPA²⁶. Esta concordancia se traduce en que el 20-30 % de los pacientes con AR son positivos para los anticuerpos anti-CarP y el FR, mientras que el 15-20 % de los pacientes negativos para el FR son positivos para los anticuerpos anti-CarP²⁶.

2.1.3 Factores etiológicos genéticos y ambientales que se han estudiado.

Factores etiológicos genéticos: complejo HLA y gen PTPN22.

La AR es una enfermedad con un claro componente genético, cuya heredabilidad se ha estimado del aproximadamente el 60 %⁸⁰. Dentro de los factores genéticos, el más importante reside en el complejo mayor de histocompatibilidad o sistema del antígeno leucocitario humano (HLA). Las posiciones aminoacídicas 11, 13, 71 y 74 de la región hipervariable de la cadena beta de la molécula HLA-DR (HLA-DRB1), son las principalmente asociadas con la AR⁸¹ (Figura 3). En estas posiciones, algunos aminoácidos se han asociado con protección frente a la AR, y otros con riesgo a desarrollar la enfermedad^{81,82}. Además, este efecto protector o de riesgo, es distinto en función de si se habla de la AR seropositiva o seronegativa^{81,82}.

La combinación de aminoácidos resultante de las posiciones 11, 13, 71 y 74 permite definir a los distintos alelos de la molécula HLA-DRB1 (Figura 3). Con mucha anterioridad a la identificación de estos aminoácidos como los más críticos, se había agrupado a los alelos de riesgo bajo la denominación de epítipo compartido (EC)^{83,84}. La mayoría de los alelos que forman parte del EC son del grupo *04 y *01, aunque también se incluye un alelo del grupo *10 y algunos del grupo *14⁸⁵. Todos ellos codifican para una secuencia de aminoácidos conservada que se extiende desde la posición 70 a la 74 de la cadena aminoacídica⁸⁵: ⁷⁰QKRAA⁷⁴, ⁷⁰QRRAA⁷⁴ y ⁷⁰RRRAA⁷⁴. Ahora se sabe que sólo dos de estos aminoácidos son críticos en combinación con los de las posiciones 11 y 13, que están en fuerte desequilibrio de ligamiento entre sí. La presencia de estos alelos confiere riesgo a desarrollar AR ACPA positiva^{86,87}. Varios estudios han demostrado que el mecanismo probable que explica esta asociación incluye que los péptidos citrulinados, respecto a los péptidos nativos, se unen preferentemente a las moléculas HLA-DRB1 codificadas por los alelos de riesgo^{88,89}. Así se presentarían los antígenos citrulinados a los linfocitos T autoreactivos, iniciando el proceso de autoinmunidad con la consecuente producción de los ACPA^{88,89}.

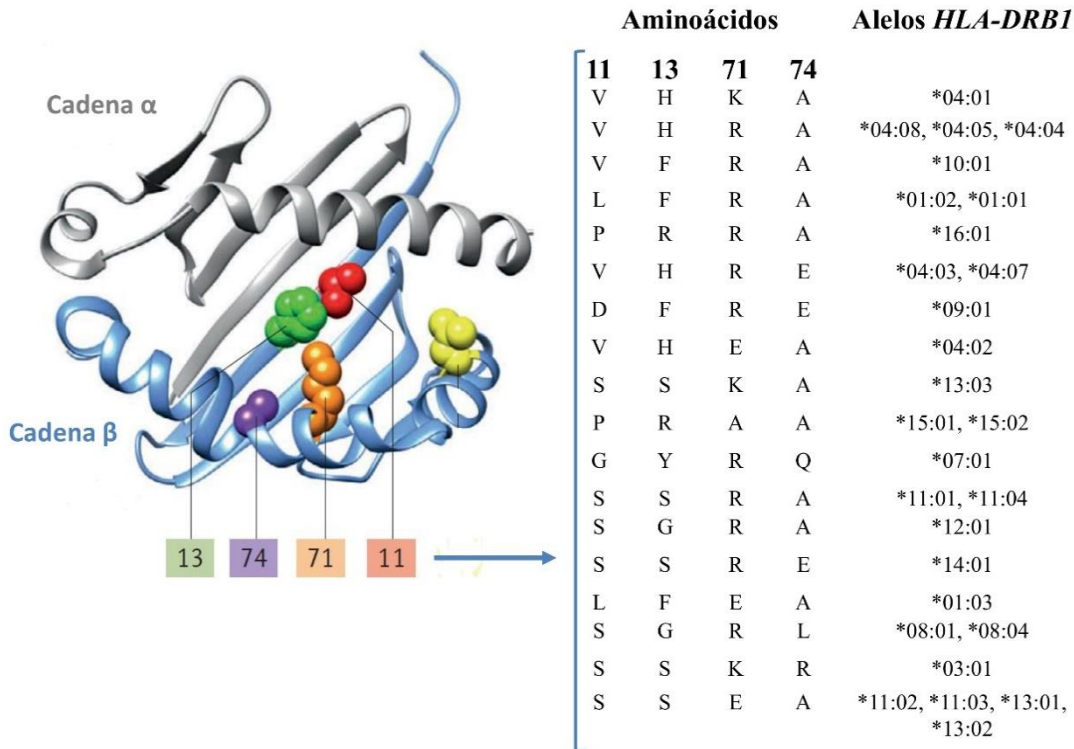


Figura 3. Molécula HLA-DRB1. Se muestran las posiciones 11, 13, 71 y 74 de la cadena beta de la molécula HLA-DRB1, y la definición de los distintos alelos que codifican para esta molécula. Imagen tomada y modificada del trabajo de *Kim K y col.*⁴⁶, permitido por Springer Nature.

Los alelos de riesgo no son los únicos alelos de la molécula HLA-DRB1 que se han asociado con la AR. Por ejemplo, algunos alelos del grupo *13 se han asociado con protección frente a la AR ACPA positiva⁹⁰, o algunos del grupo *03 con riesgo a la AR ACPA negativa^{82,91}. Sin embargo, el efecto de estos alelos sobre el riesgo de la AR es mucho menor que el del EC. Además, con la AR se han asociado alelos de las moléculas HLA-DP, HLA-A y HLA-B^{81,82}. Estas asociaciones muestran un impacto mucho menor que el de la molécula HLA-DRB1, no se han relacionado con ningún aspecto de la patogenia de la AR, y todavía no están completamente definidas. Aun así, su importancia radica en que permiten relacionar a la enfermedad con todo el complejo HLA.

A pesar del gran peso de la molécula HLA-DRB1 en la susceptibilidad a la AR, esta molécula no explica nada más que una fracción de su componente genético⁸³. Por este motivo, se ha realizado un gran esfuerzo para identificar otras variantes genéticas localizadas fuera de esta molécula. Como resultado de este esfuerzo, varios estudios de asociación de genoma

completo⁹²⁻⁹⁵ y otros de genes candidatos^{92,96-98} han identificado unos 100 loci que contribuyen al desarrollo de la AR⁸⁴. Entre ellos destaca el localizado en el gen *PTPN22*, que es el principal después del *HLA-DRB1*. Este gen codifica para una fosfatasa de tirosina linfoide que modula la señalización intracelular en los linfocitos T y B. La variante funcional de este gen, denominada *R620W*, es la que se ha asociado con la AR⁹⁶, mostrando además un efecto más fuerte en los pacientes ACPA positivos⁹⁹.

En contraste con lo comentado en relación con los ACPA, se sabe mucho menos acerca de los factores genéticos que predisponen al desarrollo de los anticuerpos anti-CarP. Los anticuerpos anti-CarP no están asociados ni con el EC, ni con el alelo de riesgo del gen *PTPN22*, algo que ha quedado demostrado en varias cohortes de pacientes europeos^{26,73} y en una cohorte de pacientes asiáticos³⁹. Esta diferencia entre ACPA y los anticuerpos anti-CarP es importante, ya que refleja la independencia de los dos tipos de autoanticuerpos. La primera evidencia sobre un factor de riesgo genético relacionado con los anticuerpos anti-CarP fue demostrada por *Jiang X y col.*⁷³. En su trabajo, el alelo *DRB1*03* se encontró asociado con el grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺. Sin embargo, esta asociación solo fue significativa al realizar la comparación con los controles sin la enfermedad, pero no respecto al grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁻⁷³. El resultado es problemático porque en otro trabajo en el que no se incluyeron a los anticuerpos anti-CarP, el alelo *DRB1*03* mostró una asociación con el conjunto de pacientes ACPA⁻⁸². Además, *Montes A y col.*, en otra cohorte de pacientes con AR, no encontraron ninguna asociación entre este alelo y los anticuerpos anti-CarP²⁶. Todo esto cuestiona la asociación de los anticuerpos anti-CarP con el alelo **03* y, en consecuencia, se puede afirmar que todavía no se conoce ninguno de los factores genéticos predisponentes al desarrollo de estos autoanticuerpos en la AR.

Factores etiológicos ambientales: tabaquismo.

El tabaco es el factor ambiental más estudiado y reconocido en la patogenia de la AR. Al igual que una parte importante del componente genético, el tabaco se encuentra principalmente asociado con el incremento de la AR seropositiva^{100,101}. Esta asociación se ha vinculado principalmente a los ACPA y, en consecuencia, el riesgo atribuible al tabaco en los pacientes positivos para estos anticuerpos es del 35 %, en comparación con el 10-20 % estimado para el conjunto global de pacientes^{102,103}. El efecto del tabaquismo en los pacientes

ACPA positivos está potenciado por la presencia del EC, ya que se ha descrito una interacción genético-ambiental entre los alelos del EC y el tabaco¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Esta interacción, junto con la presencia de proteínas citrulinadas en el lavado broncoalveolar de pacientes fumadores, ha sentado las bases de un modelo patogénico que trata de explicar la relación entre el tabaquismo y los ACPA¹⁰⁷. De acuerdo a este modelo, el tabaco induciría la citrulinación de proteínas a nivel pulmonar. Posteriormente, las proteínas citrulinadas serían presentadas a nivel del EC, favoreciendo el inicio de una respuesta autoinmune local con la producción de los ACPA en este tejido¹⁰⁷ (Figura 4).

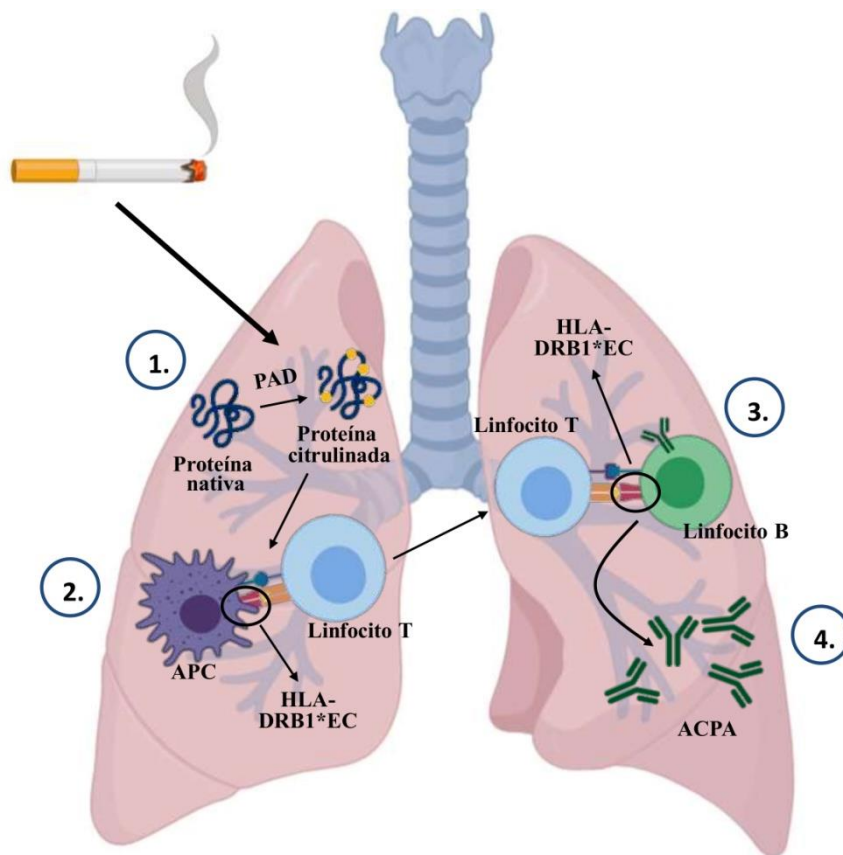


Figura 4. Modelo inmunológico de desarrollo de los ACPA a nivel pulmonar. 1) Inducción de la citrulinación de proteínas por el tabaquismo. 2) Presentación de las proteínas citrulinadas a nivel de EC expresado por las APC a los linfocitos T. 3) Presentación antigénica de las proteínas citrulinadas a los linfocitos B autoreactivos a nivel del EC. 4) Producción de los ACPA por los linfocitos B autoreactivos. Imagen de autoría propia.

A pesar de la repercusión del modelo mencionado anteriormente, no todos los hallazgos han ido acordes con esta hipótesis. Claras evidencias que cuestionan la idea del modelo patogénico son la falta de correlación entre el tabaquismo y la citrulinación de proteínas a

nivel de tejido pulmonar^{108,109}, o la asociación de la AR ACPA positiva con la presencia de ACPA en el pulmón y el desarrollo de anomalías pulmonares de manera independiente al hábito tabáquico¹¹⁰⁻¹¹³. Otros resultados que van en contra del modelo patogénico son los publicados por van *Wesemael y col.*⁵⁵. Los autores de este trabajo no encontraron una asociación específica entre los ACPA y el tabaco, sino que la presencia concordante de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP fue la característica asociada con el tabaquismo⁵⁵. Según la hipótesis del modelo, la asociación debería ser exclusiva de los ACPA con independencia de la presencia del resto de anticuerpos. *AK Herdstöm y col.* encontraron resultados similares a los de *van Wesemael y col.*, aunque no estudiaron los anticuerpos anti-CarP. En su trabajo el tabaquismo se asoció con la presencia concordante de los ACPA y el FR¹¹⁴. Además, en los pacientes positivos para uno de los dos anticuerpos, el porcentaje de fumadores se encontró significativamente incrementado en aquellos solo positivos para el FR¹¹⁴. Los resultados de *AK Herdstöm y col.* no solo ponen en duda la especificidad de la asociación del tabaquismo con los ACPA, sino que proponen al FR como un anticuerpo relevante en la asociación con el tabaco. Es evidente que hay estudios que cuestionan el papel que el modelo patogénico otorga a los ACPA en el tabaquismo. La controversia entre los trabajos comentados y la idea del modelo patogénico demanda la necesidad de realizar nuevos estudios que puedan aclarar la relación entre el hábito tabáquico y los autoanticuerpos de la AR. Esta necesidad se hace todavía mayor al tener en cuenta que en la mayoría de los estudios en los que se muestra la asociación entre los ACPA y el tabaco, no se ha considerado la presencia de otros autoanticuerpos como el FR o los anticuerpos anti-CarP.

La carbamilación de proteínas es una modificación postraducciona frecuente en fumadores⁶. Como se ha comentado en la introducción, el tiocinato presente en el tabaco puede ser oxidado por la MPO, dando lugar a la formación de cianato y favoreciendo la formación de proteínas carbamiladas². La relación del tabaco con la carbamilación de proteínas no ha sido la misma para los anticuerpos anti-CarP, ya que no se ha encontrado ninguna asociación específica entre estos anticuerpos y el hábito fumador. Dos de los principales trabajos que han estudiado esta relación no han encontrado ni siquiera una tendencia hacia la asociación entre los anticuerpos anti-CarP y el tabaquismo en la AR^{26,73}. Además, los dos estudios incluyen cohortes de pacientes lo suficientemente grandes como para tener confianza en los resultados encontrados^{26,73}. Como se ha mencionado en el párrafo

anterior, *van Wesemael y col.* asociaron a los anticuerpos anti-CarP con el tabaquismo, pero siempre en concordancia con la presencia del FR y los ACPA⁵⁵. En ninguna de las tres cohortes de pacientes con AR incluidas en el trabajo de estos autores se encontró una asociación específica entre los anticuerpos anti-CarP y el tabaco. La falta de asociación de los anticuerpos anti-CarP con el tabaquismo, sumada a la incertidumbre acerca de los factores genéticos relacionados con estos anticuerpos, refleja el desconocimiento sobre los factores etiológicos que predisponen el desarrollo de los anticuerpos anti-CarP en la AR.

2.1.4 Papel patogénico de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.

Una pregunta importante sobre los anticuerpos anti-CarP es si son causa o consecuencia en la AR. La detección de estos anticuerpos en las fases iniciales de la AR es la evidencia que mejor permite responder a este planteamiento. Los anticuerpos anti-CarP están presentes antes del inicio de la sinovitis, e incluso se encuentran en sujetos asintomáticos que posteriormente acaban desarrollando la enfermedad. De esta forma, la presencia en estas fases tempranas demuestra que los anticuerpos anti-CarP sí pueden tener un verdadero papel patogénico en la AR. A mayores, las asociaciones de los anticuerpos anti-CarP con el daño radiológico y la mortalidad de los pacientes también contribuyen a resaltar el posible papel de estos autoanticuerpos en la patogénesis. A continuación, se detallan estas tres características.

Anticuerpos anti-proteínas carbamiladas en fases previas al desarrollo de la enfermedad.

La patogenia de la AR comienza antes del desarrollo de la sinovitis clínica (Figura 5). Las primeras manifestaciones pueden consistir solo en artralgia, sin mostrar inflamación clínicamente detectable¹¹⁵. Posteriormente, los pacientes desarrollan artritis, con dolor articular acompañado ahora de inflamación o sinovitis¹¹⁶. Cuando los pacientes presentan menos de un año de evolución desde el inicio del primer cuadro de inflamación articular se dice que tienen artritis de reciente comienzo o artritis de inicio (EA)¹¹⁷⁻¹²². Si bien es cierto que en algunos trabajos se incluyen pacientes con una evolución de hasta 2 o 3 años¹²³⁻¹²⁵. Los pacientes con EA pueden presentar un cuadro clínico variable, incluyendo un 30-50 % con artritis indiferenciada (AI), que denomina a los que no se pueden clasificar dentro de un diagnóstico específico¹²⁶. Otra fracción similar de los pacientes con EA cumplirá los criterios

de clasificación de la AR (comentados en el siguiente apartado), ya sea desde la primera visita o a lo largo del seguimiento. Una vez alcanzado el diagnóstico de AR, los pacientes se pueden encontrar en dos fases diferentes en función del tiempo de evolución de la misma: AR temprana y AR establecida. Por lo general, se utilizan 6 meses de evolución como criterio para establecer la diferenciación entre ambas¹²⁷. Es importante tener en cuenta que no todos los pacientes con EA acaban desarrollando AR. Pueden evolucionar a otra enfermedad articular inflamatoria bien definida, resolverse espontáneamente, o bien persistir de manera indiferenciada^{128,129}. Esta variabilidad determina la necesidad de encontrar biomarcadores presentes en las fases iniciales de la enfermedad que permitan distinguir a los pacientes que acabarán desarrollando la AR de los pacientes que evolucionen hacia otros diagnósticos.

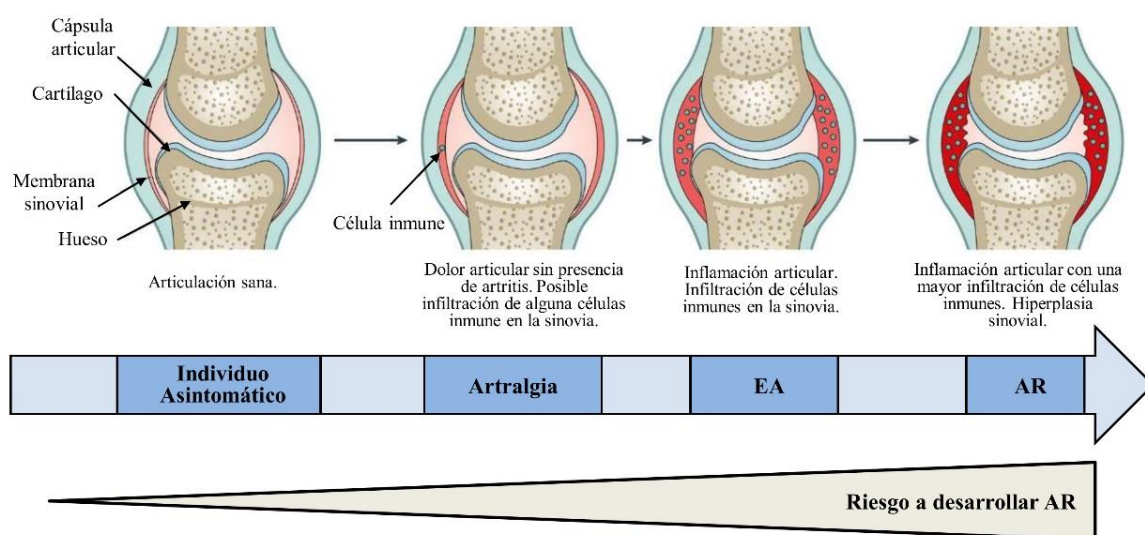


Figura 5. Evolución de la AR. Imagen tomada y modificada del trabajo de *Smolen JS y col.*⁴³, permitido por Springer Nature.

El FR y los ACPA podrían utilizarse como este tipo de biomarcadores, ya que ambos se encuentran en las fases previas al desarrollo de las manifestaciones clínicas de la AR. Los dos anticuerpos se han identificado en sujetos sin sintomatología, hasta 10 años antes del inicio de la clínica¹³⁰⁻¹³². La presencia de los ACPA y el FR también se ha comprobado en las fases iniciales de la AR mediante estudios realizados en cohortes de pacientes con artralgia^{133,134} y en pacientes con EA¹³⁵. Además, los títulos de ambos anticuerpos y la expansión de epítomos de los ACPA se incrementan con las distintas fases por las que pasa la enfermedad, siendo este incremento mucho más marcado en los 2 años previos al inicio de la artritis clínica^{130,131,136-139}. La presencia del FR y los ACPA en las fases preclínicas de la AR justifica

el uso de estos anticuerpos como biomarcadores de predicción. Su utilidad como biomarcadores de este tipo queda respaldada por el uso de ambos anticuerpos en las recomendaciones de la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR), establecidas para definir los factores de riesgo de AR asociados a cada una de las fases por las que puede pasar un individuo con la enfermedad¹¹⁶. En la segunda fase propuesta por estas recomendaciones el riesgo a AR viene determinado por la presencia del FR o los ACPA¹¹⁶ (Figura 6). En esta fase todavía no hay sintomatología clínica, y en ella los pacientes positivos para el FR o los ACPA tienen una probabilidad mayor de desarrollar AR en el futuro que los pacientes negativos para los dos anticuerpos.

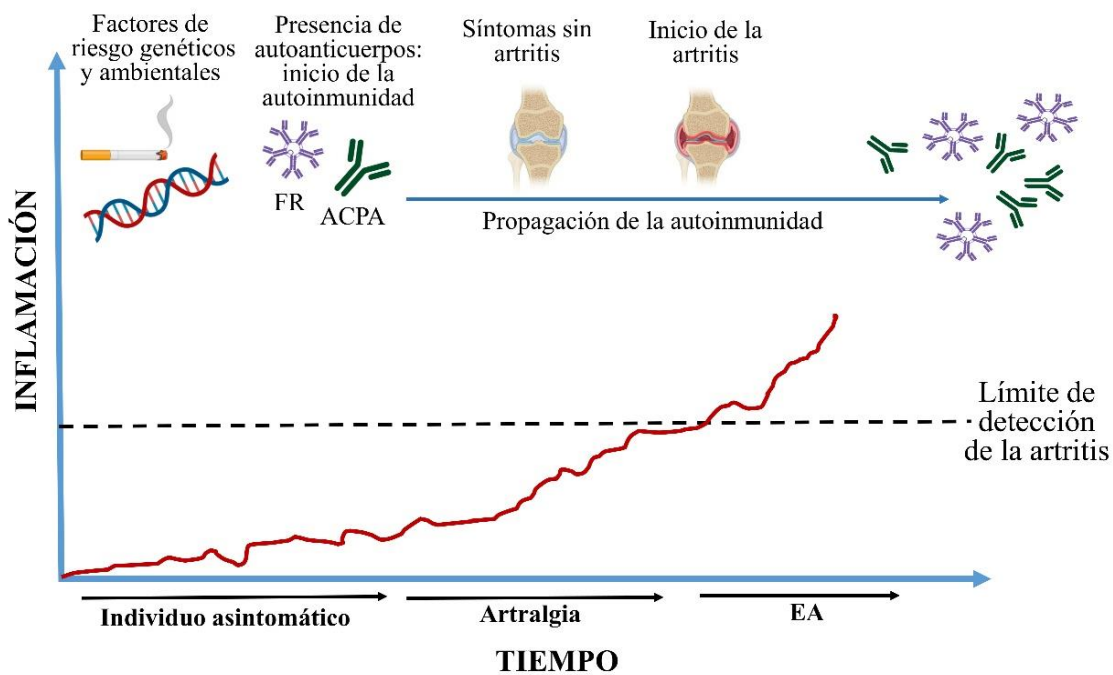


Figura 6. Factores de riesgo asociados a cada una de las fases previas al inicio de la AR. En la figura se representan las recomendaciones establecidas por el EULAR para definir a estos factores. En la primera fase el riesgo a padecer AR viene determinado por los factores genéticos y ambientales, como la presencia del EC y el tabaquismo. En la segunda fase el riesgo queda establecido por la presencia del FR y los ACPA, aun con ausencia de sintomatología; y en la tercera y cuarta etapas, por la presencia de síntomas sin artritis e inicio de artritis todavía no desarrollada a AR, respectivamente. Imagen de autoría propia.

Los anticuerpos anti-CarP también pueden detectarse antes del inicio de la clínica. Tres trabajos realizados en pacientes asintomáticos muestran la presencia de estos anticuerpos en las fases preclínicas de la AR. El trabajo publicado por *Shi J y col.* fue el primero en encontrar a los anticuerpos anti-CarP en individuos asintomáticos holandeses, hasta 10 años antes del inicio de la clínica¹⁴⁰. Resultados similares fueron encontrados por *Gan RW y col.* en

individuos sin sintomatología procedentes de EEUU¹⁴¹. Los autores de este estudio detectaron un 16 % de positividad para los anticuerpos anti-CarP durante los 10-5 años previos al inicio de la artritis¹⁴¹. Sumado a estos dos trabajos está el estudio realizado en sujetos suecos por *Brink M y col.*¹⁴². En este caso, 5 años antes del inicio de la clínica el 14 % de los individuos asintomáticos ya era positivo para los anticuerpos anti-CarP¹⁴². En los tres estudios también se encontró un incremento similar de los títulos de los anticuerpos anti-CarP en los años próximos al inicio de la clínica, al igual que lo comentado en el párrafo anterior para los ACPA y el FR¹⁴⁰⁻¹⁴²

Los trabajos elaborados en sujetos sin manifestaciones clínicas son la mejor evidencia de la existencia de los anticuerpos anti-CarP en las fases preclínicas. Aun así, la anticipación de esta autoinmunidad está reafirmada por estudios realizados en sujetos con una sintomatología más cercana al inicio de la artritis. Los trabajos de *Shi J y col.* y *ten Brink RM y col.* confirmaron la presencia de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con artralgia, aunque con resultados discrepantes entre ellos. Así, el 39 % de los pacientes incluidos en el trabajo de *Shi J y col.* fue positivo para los anticuerpos anti-CarP¹⁴³, en contraste con el 10 % de reactividad encontrada en la cohorte del trabajo de *ten Brink RM y col.*¹³⁴. Esta discrepancia podría explicarse con los criterios de inclusión de los pacientes, que fueron distintos en cada uno de los estudios. Los pacientes de *Shi J y col.* se incluyeron por ser positivos para el FR o los ACPA, y por presentar ausencia de artritis en 44 articulaciones y una historia de artralgia de entre 1-2 años de evolución. En el estudio de *ten Brink RM y col.* los pacientes se seleccionaron por presentar menos de un año de evolución y artralgia únicamente en las articulaciones de las manos o los pies, sin la necesidad de que tuviesen FR o ACPA. La evolución mayor de los pacientes de *Shi J y col.* y su positividad para el FR o los ACPA indica que un porcentaje considerable de los pacientes acabarán desarrollando artritis en el futuro. Algo que explica por qué el porcentaje de positivos para los anticuerpos anti-CarP es más elevado en estos pacientes respecto a los del estudio de *ten Brink RM y col.* Además, los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP son bastante concordantes, y por lo tanto tienden a coexistir. Con la presencia de los ACPA o el FR, no es extraño encontrar positividad para los anticuerpos anti-CarP.

La existencia de anticuerpos anti-CarP en sujetos asintomáticos y pacientes con artralgia hace que sea lógico encontrar esta positividad en pacientes con artritis. Efectivamente, en

pacientes con EA procedentes de Holanda¹⁴⁴ y Francia¹⁴⁵, los anticuerpos anti-CarP mostraron una positividad del 26 y 33 % respectivamente. Un porcentaje similar (20 %) se encontró en una cohorte del Reino Unido formada por pacientes con artritis inflamatoria¹⁴⁶. Este último resultado no puede combinarse con los de las dos cohortes de EA. La cohorte del Reino Unido mencionada incluye pacientes con artritis pero sin una duración determinada. La falta de este límite en la evolución impide que puedan tratarse como EA, y hace que sea más correcto utilizar el término de artritis inflamatoria.

La presencia de los anticuerpos anti-CarP en los grupos de pacientes comentados: asintomáticos, con artralgia y con signos de artritis, confirma la anticipación de esta reactividad frente a las manifestaciones clínicas de la AR. La principal importancia radica en el carácter patogénico que estos resultados le otorgan a los anticuerpos anti-CarP en la enfermedad. Además, la presencia en las fases preclínicas abre la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores que ayuden a seleccionar a los pacientes que acabarán desarrollando AR en el futuro.

Asociación con la progresión radiológica.

La masa ósea de los pacientes con AR puede estar alterada y disminuida debido al daño articular progresivo que causa la enfermedad (Figura 7). La destrucción articular de la AR se puede manifestar a través de tres tipos de lesiones óseas: erosiones, pérdida ósea yuxtaarticular y pérdida ósea generalizada¹⁴⁷. Las tres formas de pérdida ósea difieren en su localización anatómica y en su etiopatogenia. Las erosiones son pérdidas localizadas en las articulaciones inflamadas, que afectan al hueso cortical y al hueso trabecular localizado inmediatamente debajo. Ocurren en las superficies óseas que están en contacto con la sinovia inflamada, y son consecuencia de mediadores inflamatorios (moleculares y celulares) localizados en este tejido¹⁴⁸. Las pérdidas óseas yuxtaarticular y generalizada disminuyen la densidad mineral ósea (DMO) en zonas localizadas a una distancia de las articulaciones inflamadas, ya sea cerca o lejos de ellas, respectivamente^{147,149}. En este caso, aunque los mediadores inflamatorios también son importantes, las alteraciones hormonales¹⁵⁰, la incapacidad funcional¹⁵¹ o el déficit de vitamina D¹⁵² son otros factores que pueden afectar a la disminución de la DMO.

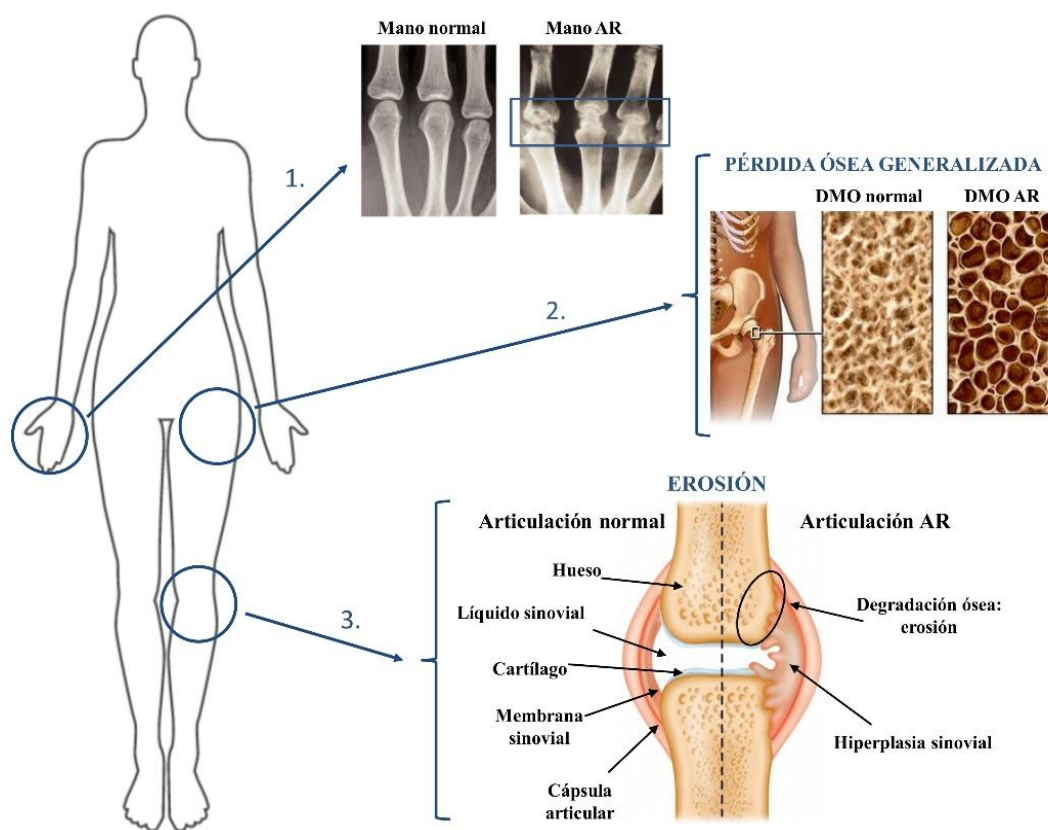


Figura 7. Daño articular en la AR. 1) Radiografía procedente de la mano de un paciente con AR mostrando 3 articulaciones metacarpofalángicas (MCF). Los espacios entre las articulaciones han disminuido por la degradación del cartilago y destrucción ósea (erosión). Imagen tomada del trabajo de Smolen JS y col.¹⁵³, permitido por Springer Nature. 2) Representación de la pérdida ósea en la cabeza del fémur de un paciente con AR. Imagen con licencia Creative Commons. 3) Comparación entre la anatomía de una articulación normal y la de un paciente con artritis erosiva. Imagen adaptada con licencia Creative Commons.

Los mediadores inflamatorios implicados en cada uno de los tres tipos de lesiones llevan a la pérdida ósea mediante la activación y diferenciación de los osteoclastos, e inhibición de los osteoblastos^{148,154-156}. Además de la contribución de los mediadores inflamatorios, hay un mecanismo adicional que puede contribuir a la pérdida ósea y que está mediado por autoanticuerpos^{51,147,148}. Se ha visto que los ACPA pueden reconocer proteínas citrulinadas expresadas en la superficie de los osteoclastos, causando resorción y pérdida ósea por la activación de este tipo celular^{157,158}. No se ha descrito que el FR tenga un papel directo sobre este tipo de lesiones, aunque podría favorecer la pérdida ósea potenciando el efecto de los ACPA¹⁵⁹. Estas evidencias en cultivos celulares están respaldadas por otros estudios observacionales en los que los ACPA y el FR se asocian con la pérdida ósea de los pacientes. Las erosiones forman el tipo de lesión que mejor se ha estudiado en relación con el FR y los

ACPA. Los dos autoanticuerpos se asocian tanto con la progresión como con la presencia de artritis erosiva, mostrando los ACPA un efecto mayor que el FR^{147,148}. La relación de los ACPA y el FR con la pérdida de la DMO a nivel más generalizado no está tan bien definida. La relación más importante se ha establecido para los ACPA, anticuerpos que muestran una asociación con la disminución de la DMO de la cadera y la espina lumbar¹⁶⁰⁻¹⁶³. Con el FR no se ha descrito ninguna asociación, aunque en el trabajo publicado por *Bugatti S y col.* los títulos altos del FR potenciaron la asociación de los ACPA con la disminución de la DMO¹⁶⁰.

Los anticuerpos anti-CarP también se han asociado con una mayor destrucción radiológica. Esta característica patogénica se ha definido gracias a estudios de asociación que han abordado la relación de los anticuerpos anti-CarP con la presencia y progresión de erosiones en los pacientes con AR. La asociación de los anticuerpos anti-CarP con este tipo de lesiones no ha sido lo más relevante, ya que destaca más que el efecto de estos anticuerpos sobre el daño articular presente un componente independiente del resto de autoanticuerpos. Así, por ejemplo, *Montes A y col.* encontraron a los anticuerpos anti-CarP asociados con la artritis erosiva de forma independiente a la presencia de los ACPA²⁶. El resultado de *Montes A y col.* se amplía más con los estudios longitudinales de *Brink M y col.*²⁷ y *Ajeganova S y col.*⁵⁴, en los que los anticuerpos anti-CarP no solo se asociaron con la presencia de erosiones, sino que también lo hicieron con la peor progresión radiológica. Los pacientes de *Brink M y col.* se siguieron durante 2 años, y los incluidos en el trabajo de *Ajeganova S y col.* durante un total de 8. En los dos estudios la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la progresión radiológica fue significativa tanto en el conjunto global de pacientes como en los pacientes negativos para los ACPA, reforzando el componente independiente de esta asociación.

Es evidente que los anticuerpos anti-CarP se asocian con la progresión radiológica de los pacientes con AR, y que su efecto muestra un componente independiente. La independencia de la asociación es sin duda algo destacable, ya que refuerza la utilidad de los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores. La determinación de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes ACPA negativos podría ayudar a conocer el daño radiológico del paciente a largo plazo, algo que resultaría útil a la hora de orientar el tratamiento o la monitorización del paciente por el reumatólogo. La evidencia de esta asociación no es la misma para la pérdida ósea generalizada. La relación entre los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de DMO es uno de

los objetivos de este proyecto. Los resultados ya publicados (Anexo 4) que serán comentados más adelante son los únicos que abordan este tema. Asimismo, tampoco se han realizado estudios *in vitro*, por lo que resulta difícil proponer un mecanismo patogénico que explique la asociación de los anticuerpos anti-CarP con el daño articular de los pacientes con AR.

Asociación con la mortalidad.

Los pacientes con AR se caracterizan por presentar un incremento en la tasa de mortalidad de hasta dos veces más que el de la población general¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Este incremento afecta de forma negativa sobre la calidad de vida de los pacientes, ya que supone una disminución de la esperanza de vida de entre 3 y 10 años^{165,168}. El incremento de mortalidad se ha atribuido a la presencia de distintas comorbilidades, principalmente aquellas relacionadas con enfermedades cardiovasculares y respiratorias¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Sin embargo, los mecanismos que llevan a este incremento todavía no se conocen de una manera clara. El tabaquismo, la inflamación, la presencia del EC o la incapacidad funcional del paciente son algunos de los factores que se han relacionado con la mortalidad de la AR^{165,172}.

La presencia de autoanticuerpos también se ha relacionado con el incremento de la mortalidad de los pacientes con la enfermedad. El FR y los ACPA han sido los más analizados, y ambos se han asociado con la mortalidad de los pacientes. Sin embargo, los resultados han sido bastante discrepantes¹⁷³⁻¹⁷⁶. La asociación con la mortalidad se ha vinculado exclusivamente al FR en trabajos como el de *Ajeganova S y col.*¹⁷³, mientras que en estudios como el de *Milkus TR y col.* la asociación estuvo claramente dominada por los ACPA¹⁷⁶. A caballo entre estos dos resultados, está el trabajo de *Humphreys JH y col.*, donde los ACPA y el FR mostraron una contribución aditiva sobre el incremento de la mortalidad¹⁷⁵.

La relación entre los anticuerpos anti-CarP y la mortalidad de los pacientes con AR se ha analizado en dos trabajos. En los dos estudios los anticuerpos anti-CarP mostraron una asociación significativa con el incremento de la mortalidad. El primer trabajo a comentar es el publicado por *Ajeganova S y col.*¹⁷³, quienes estudiaron la relación entre la mortalidad y la presencia de los anticuerpos anti-CarP, el FR o los ACPA en tres cohortes de pacientes independientes. La contribución de los anticuerpos anti-CarP sobre el incremento de la mortalidad fue significativa en las tres cohortes. Además, en una de las cohortes incluidas la

asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mortalidad fue claramente dominante a la del FR y los ACPA. En la segunda cohorte el efecto dominante se atribuyó al FR, y en la tercera los tres autoanticuerpos presentaron una contribución aditiva sobre el incremento de la mortalidad¹⁷³. El segundo trabajo que abordó este tema fue publicado por *Vidal L y col.*¹⁷⁷. La cohorte de pacientes estudiada por estos autores mostró de nuevo la asociación significativa de los anticuerpos anti-CarP sobre el incremento de la mortalidad. Además, *Vidal L y col.* encontraron que el efecto de los anticuerpos anti-CarP era claramente dominante al resto de autoanticuerpos¹⁷⁷. Con esto sabemos que los anticuerpos anti-CarP guardan relación con la mortalidad de la AR. Sin embargo, no podemos asegurar cuál es la contribución de cada autoanticuerpo sobre este fenómeno. Algo que también desconocemos es si la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mortalidad se atribuye a alguna causa de muerte específica. Los resultados de *Ajeganova S y col.*¹⁷³ vincularon a estos anticuerpos con causas de muerte cardiovasculares, mientras que en el trabajo de *Vidal L y col.*¹⁷⁷ los anticuerpos anti-CarP mostraron una relación con causas de muerte de tipo respiratorias. Estos últimos resultados hay que interpretarlos con precaución, ya que todavía se necesitan más estudios para analizar las causas de muerte asociadas tanto con los anticuerpos anti-CarP como con el resto de autoanticuerpos. Además, la recogida de datos en este caso es de vital importancia. Se necesitan datos rigurosos que permitan definir la causa de muerte del paciente, así como también un número de pacientes suficiente en cada grupo definido por las distintas causas de muerte a analizar. En cualquier caso, la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mortalidad de los pacientes refuerza el papel patogénico que tienen estos anticuerpos en la enfermedad.

2.1.5 Implicaciones clínicas de los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas.

Valor pronóstico.

Las asociaciones de los anticuerpos anti-CarP con la progresión radiológica y el incremento de la mortalidad comentadas anteriormente, sugieren que estos anticuerpos podrían utilizarse como biomarcadores pronósticos de la enfermedad. Además, hay algunos estudios mostrando que los anticuerpos anti-CarP se pueden asociar con otros parámetros de severidad de la AR, como el grado de actividad de la enfermedad. Estos estudios, que serán comentados a lo largo de este apartado, refuerzan la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores de este tipo.

En la práctica clínica diaria suelen utilizarse índices que permiten monitorizar y valorar la evolución de los pacientes con AR. Estos índices miden distintos aspectos de la actividad de la enfermedad y del grado de incapacidad funcional del paciente. En la clínica, el índice de actividad de la enfermedad-28 (DAS28) es el más utilizado para valorar la actividad de la AR¹⁷⁸. El DAS28 se calcula mediante una fórmula que tiene en cuenta el número de articulaciones dolorosas y el de articulaciones tumefactas valoradas a partir de la exploración de un total de 28 articulaciones en el paciente, la velocidad de sedimentación globular (VSG) o la proteína C reactiva (PCR), y la evaluación general de la enfermedad realizada por el paciente mediante una escala analógica visual de 0 (el mejor valor posible) a 100 (el peor valor)¹⁷⁹ (Figura 8). También se ha desarrollado una fórmula que permite calcular el DAS28 utilizando únicamente las tres primeras variables, sin incluir la valoración global del paciente¹⁷⁹. El valor del DAS28 determina si un paciente presenta una actividad de la enfermedad alta (valor > 5.1), una actividad moderada (valor entre $5.1 - > 3.2$), una actividad baja (valor entre $> 2.6 - 3.2$) o bien si se encuentra en remisión (valor ≤ 2.6). Además de su importancia en la valoración de la actividad de la AR, el DAS28 se utiliza en las decisiones terapéuticas; tanto para elegir el tratamiento inicial, como para evaluar la eficacia de los tratamientos. La eficacia del tratamiento vendría determinada por los cambios en el valor de este índice¹⁸⁰. Utilizando los datos de la actividad basal y los cambios del DAS8 tras el tratamiento, se puede clasificar a los pacientes en buenos respondedores, respondedores moderados o no respondedores¹⁸⁰.

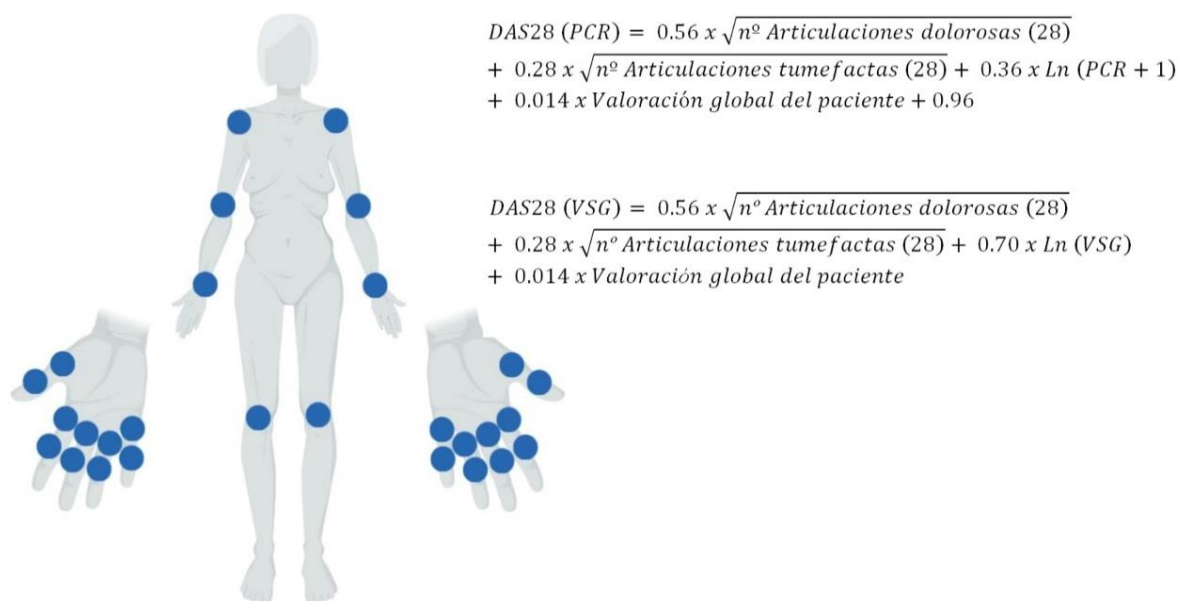


Figura 8. Cálculo del DAS28. Se indican las fórmulas utilizadas para calcular el DAS28 utilizando la VSG o la PCR. En la figura se muestran las 28 articulaciones exploradas para realizar este cálculo. Imagen de autoría propia.

Actualmente, el objetivo de la estrategia terapéutica ideal consiste en alcanzar la remisión del paciente o al menos una baja actividad de la enfermedad. Este enfoque ha sido establecido por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, American College of Rheumatology), el EULAR y la Liga de Asociaciones de Reumatología del Asia-Pacífico (APLAR, Asia Pacific League of Associations for Rheumatology). El tratamiento utilizado debe mostrar una mejoría en la actividad de la enfermedad durante los 3 primeros meses, y el objetivo terapéutico tiene que ser alcanzado durante los 3 meses siguientes. De no ser así, el tratamiento debe ser adaptado o modificado¹⁸¹⁻¹⁸³. Los distintos tratamientos utilizados en la AR incluyen a los glucocorticoides (GC) y a los fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs)⁴⁴. Estos últimos pueden ser sintéticos o biológicos. Dentro de los sintéticos se diferencian dos grupos, los convencionales, de los cuales el más utilizado es el metotrexato (MTX), y los dirigidos contra una molécula específica (Tabla 2). De forma general, las recomendaciones más recientes del EULAR, indican que el tratamiento se debe iniciar con MTX combinado con GC. Para el MTX se recomienda ir incrementando la dosis hasta alcanzar los 20-25 mg / semana, mientras que la dosis de los GC debe ser moderada y en pauta descendente. Las guías EULAR únicamente recomiendan utilizar otro FAME, como la leflunomida (LEF), la sulfasalacina (SZL) o los antipalúdicos (AP, Hidroxicloroquina o cloroquina) en caso de

contraindicación o intolerancia al MTX. Si la respuesta no es suficiente, se recomienda utilizar una combinación de varios FAMEs, o bien combinar el primer tratamiento con un biológico. Aquí juegan un papel muy importante los factores pronósticos, ya que la decisión de combinar el primer FAME con un biológico o no, depende de la presencia o ausencia de estos factores, respectivamente. Si con el primer biológico tampoco se consigue una respuesta adecuada o hay que suspenderlo por efectos adversos, se iniciaría el tratamiento con un segundo biológico. El tratamiento se iría modificando hasta conseguir el objetivo terapéutico deseado. Una vez alcanzada la remisión o la baja actividad durante al menos 6 meses, se contempla la reducción del tratamiento, sobre todo de los tratamientos biológicos por sus posibles toxicidades o efectos adversos¹⁸¹. Así, encontrar marcadores asociados con una mayor actividad de la enfermedad y, por lo tanto, con un mal pronóstico de la AR se hace de vital importancia. El uso de estos marcadores permitiría dirigir el tratamiento de una forma adecuada, seleccionar aquellos pacientes que requieren un control más agresivo y alcanzar el objetivo terapéutico de una forma rápida y eficaz. Además, el tratamiento precoz de la AR es esencial para mejorar el pronóstico de la enfermedad¹⁸⁴. Varios estudios muestran que el tratamiento de los pacientes con AR temprana mejora el éxito a largo plazo¹⁸⁵⁻¹⁸⁹. De esta forma, existe un periodo de tiempo conocido como “ventana de oportunidad” durante el cual el tratamiento del paciente es fundamental para mejorar el resultado de la enfermedad¹⁹⁰. Como consecuencia, los pacientes se tratan pronto, siendo una de las recomendaciones del EULAR el iniciar el tratamiento del paciente tan pronto como el diagnóstico de la AR sea realizado¹⁸¹. Incluso en la guía clínica del EULAR para el tratamiento de la EA se recomienda iniciar el tratamiento con FAME en aquellos pacientes en los que se pueda llegar a desarrollar una enfermedad persistente (idealmente dentro de los 3 primeros meses desde el inicio de los síntomas de EA)¹⁹¹. En este sentido, los biomarcadores pronósticos también son fundamentales en los pacientes con EA, ya que ayudarían a seleccionar el tratamiento más adecuado para controlar la enfermedad a largo plazo.

Tabla 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la AR. JAK: janus quinasas, TNF: factor de necrosis tumoral, IL-6: interleucina

TRATAMIENTO	DIANA	ESTRUCTURA	DOSIS TÍPICA	EFECTOS ADVERSOS
FAMES SINTÉTICOS				
Convencionales				
Metotrexato	Desconocida	Pequeña molécula sintética	10-25 mg / semana	Náusea, estomatitis, neumonitis, hepatotoxicidad
Sulfasalacina	Desconocida	Pequeña molécula sintética	2-4 gr / día	Hipersensibilidad, náusea, agranulocitosis
Lefunomida	Dihidro-orato deshidrogenasa	Pequeña molécula sintética	20 mg/ día	diarrea, hipertensión, leucocitopenia
Hidroxicloroquina, cloroquina				
	Desconocida	Pequeña molécula sintética	400 mg/día, 250 mg/ día	Retinopatía
Dirigidos¹				
Tofacitímib	JAK 1,2,3	Pequeña molécula sintética	10 mg/ día	Infecciones, reactivación de la tuberculosis,
Baricitímib	JAK 1,2	Pequeña molécula sintética	2-4 mg/ día	hepes zóster, citopenias
FAMES BIOLÓGICOS				
Originales²				
Etanercept	TNF	Receptor del TNF fusionado con la región Fc de una IgG1 humana	50 mg/ semana	Infecciones, reactivación de la tuberculosis, reacciones a la inyección o a las infusiones, cambios en la piel psoriasisiformes, exacerbación de enfermedades desmielinizantes
Infliximab	TNF	Anticuerpo quimérico monoclonal	3-10 mg/kg cada 8 semanas	
Adalimumab	TNF	Anticuerpo humano monoclonal	40 mg cada 3 semanas	
Golimumab	TNF	Anticuerpo humano monoclonal	50 mg/ mes	
Certolizumab	TNF	Fragmentos Fab´ de un anticuerpo humano monoclonal.	200 mg/ cada 2 meses	
Tocilizumab	Receptor IL-6	Anticuerpo humano monoclonal	162 mg/ semana	Infecciones, reactivación de la tuberculosis,
Sarilumab	Receptor IL-6	Anticuerpo humano monoclonal	150-200 mg/ cada 2 semanas	reacciones de hipersensibilidad, neutropenia
Rituximab	CD20	Anticuerpo quimérico monoclonal	1000 mg/ cada 6 meses	Hipersensibilidad, reactivación de la hepatitis B
Abatacept	CD80/86	Receptor CTLA-4 fusionado con la región Fc de una IgG1 humana	125 mg/ semana	Infecciones, reactivación de la tuberculosis, leucocitopenia, reacción a la inyección

¹Los FAMES dirigidos, a diferencia de los convencionales, son moléculas químicas sintetizadas contra una molécula diana específica. ²Algunos de los FAMES biológicos (etanercept, infliximab, adalimumab y rituximab) cuentan con biosimilares, que son versiones de los biológicos originales con algunas diferencias físico-químicas. El precio de los biosimilares es menor al de los originales, aun presentando una eficacia y unos efectos adversos muy parecidos.

Los trabajos en los que se ha valorado la relación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de los pacientes refuerzan la posibilidad de utilizar a estos anticuerpos como biomarcadores predictores de una evolución más severa de la AR. En todos los trabajos en los que se ha estudiado esta relación se incluyeron muestras de pacientes en fases tempranas de la enfermedad. Así, los pacientes con artritis inflamatoria positivos para los anticuerpos anti-CarP mostraron una mayor actividad de la enfermedad que los pacientes negativos en el estudio de *Humpreys J y col.*¹⁴⁶. Los pacientes se siguieron durante 20 años, y la actividad de la enfermedad se valoró con el DAS28 al inicio y cada 5 años de seguimiento. Los anticuerpos anti-CarP se asociaron con la mayor actividad tanto al inicio como durante el seguimiento. Los ACPA también se asociaron con la mayor actividad tanto basal como a lo largo del tiempo. Por el contrario, la actividad de los pacientes positivos para el FR no fue diferente de la de los pacientes negativos. *Humpreys J y col.* también analizaron la asociación con la actividad en un modelo multivariante incluyendo a los anticuerpos anti-CarP y a los ACPA. En el análisis multivariante los dos anticuerpos permanecieron asociados significativamente con el DAS28, lo que impide confirmar si uno de los dos anticuerpos contribuye más que el otro en la actividad. Unos resultados similares fueron encontrados por *Truchetet ME y col.*¹⁴⁵. En este caso se incluyeron pacientes con EA procedentes de la cohorte francesa ESPOIR, que recibieron un seguimiento durante 8 años. La actividad de la enfermedad se evaluó utilizando el DAS28 al inicio, a los 3 años y al final del seguimiento. *Truchetet ME y col.* confirmaron la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad al observar que el valor del DAS28 en los pacientes anti-CarP positivos era mayor que el de los negativos, tanto al inicio como a los 3 años de seguimiento. Los hallazgos de *Humpreys J y col.* y *Truchetet ME y col.* quedaron reforzados por el trabajo de *Derksen VFAM y col.*, realizado en 3 cohortes de pacientes con AR temprana¹⁹². Una diferencia respecto a los estudios comentados, es que *Derksen VFAM y col.* únicamente evaluaron la actividad de los pacientes al inicio. Aun así, sus resultados contribuyen a asegurar la relación entre los anticuerpos anti-CarP y la actividad de la enfermedad. En las 3 cohortes analizadas el valor del DAS28 fue mayor en los pacientes positivos para los anticuerpos anti-CarP. Además, la asociación se mantuvo significativa aun teniendo en cuenta a los ACPA y al FR, sugiriendo que el efecto de los anticuerpos anti-CarP sobre la actividad presenta un componente independiente del resto de autoanticuerpos.

Las recomendaciones EULAR para el tratamiento de los pacientes con EA y AR, incluyen a la presencia de ACPA y FR dentro de los factores de mal pronóstico a tener en cuenta para dirigir el tratamiento del paciente, aunque no se han establecido reglas específicas de interpretación o actuación relacionadas con estos anticuerpos^{181,191}. Los resultados de los trabajos sobre la relación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad, sumados a los estudios que reflejan su contribución en la progresión radiológica y la mortalidad, podrían justificar la inclusión de los anticuerpos anti-CarP como otro factor pronóstico a considerar. Sin embargo, no está claro si la determinación de estos anticuerpos ayudaría al reumatólogo en la monitorización de los pacientes y en las decisiones terapéuticas. Todavía se necesitan más estudios con los que se pueda estimar la aportación de los anticuerpos anti-CarP sobre el resto de variables utilizadas por el clínico en el control de la enfermedad.

La actividad de la enfermedad no es la única variable a valorar en la práctica clínica. También se realiza una evaluación del grado de incapacidad funcional de los pacientes. El índice más utilizado es el Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ, *Health Assessment Questionnaire*). El HAQ consiste en un cuestionario con una serie de preguntas que permiten conocer de qué forma la enfermedad afecta a la calidad de vida del paciente. Según las respuestas, el clínico obtiene un valor que puede oscilar desde 0 (no incapacidad) a 3 (máxima incapacidad)¹⁹³. Un grado elevado de discapacidad está considerado como indicador de mal pronóstico¹⁹⁴⁻¹⁹⁶, por lo que la identificación de biomarcadores asociados con valores elevados de HAQ a largo plazo también resultaría útil en el manejo de los pacientes.

Los anticuerpos anti-CarP se han relacionado con el HAQ de los pacientes, aunque no son muchos los trabajos que han estudiado esta relación. Únicamente se pueden comentar dos, con resultados discrepantes entre ellos. La asociación de los anticuerpos anti-CarP con el HAQ se valoró en el estudio de *Humphreys J y col.* comentado en el párrafo anterior. Los pacientes anti-CarP positivos presentaron un HAQ significativamente mayor que los negativos. Además, este efecto de los anticuerpos anti-CarP sobre la incapacidad funcional mostró un componente independiente del resto de autoanticuerpos¹⁴⁶. Un segundo trabajo publicado por *Ajeganova S y col.*¹⁹⁷ intentó replicar los resultados de *Humphreys J y col.* En este caso se incluyeron pacientes con AR temprana procedentes de la cohorte de EA de Leiden y de la cohorte sueca de BARFOT. El HAQ se recogió en los pacientes de la cohorte de Leiden

anualmente durante 5 años. En la cohorte de BARFOT el HAQ se evaluó al inicio, a los 6 meses, y al primer, segundo, quinto y octavo año de seguimiento. Los resultados fueron opuestos a los del trabajo de *Humphreys J y col.*, ya que los anticuerpos anti-CarP no se asociaron con el HAQ en ninguna de las dos cohortes analizadas. La discrepancia de los resultados impide sacar una conclusión clara acerca del efecto que los anticuerpos anti-CarP tienen sobre la incapacidad funcional. De esta forma, aunque parece que los anticuerpos anti-CarP podrían utilizarse como biomarcadores pronósticos del grado de actividad de la AR, no está tan claro que se relacionen con el grado de incapacidad funcional de los pacientes.

Valor diagnóstico.

La importancia del control precoz de la AR hace que sea esencial clasificar a los pacientes con la enfermedad lo antes posible. La posibilidad de clasificar como AR a los pacientes menos evolucionados permite a los reumatólogos iniciar un tratamiento temprano, y de esta forma aprovechar la “ventana de oportunidad” para mejorar el pronóstico a largo plazo. Esta tarea se ha visto facilitada por el desarrollo de los nuevos criterios de clasificación de la AR. Los criterios fueron elaborados por la ACR y el EULAR en el año 2010, y su objetivo consistió en mejorar la clasificación de la AR de corta evolución para tratar a los pacientes con FAMEs lo antes posible¹⁹⁸. Antes de su creación, la clasificación de los pacientes con AR se realizaba utilizando los criterios creados por la ACR en el año 1987. A diferencia de los criterios del 2010, los de 1987 tuvieron como objetivo diferenciar a los pacientes con AR establecida de los que presentan otro tipo de artropatía inflamatoria¹⁹⁹.

Los criterios ACR/EULAR 2010 incluyen una serie de variables a las que se les da una puntuación distinta en función de las características del paciente¹⁹⁸. El paciente es clasificado con AR si la suma global de las puntuaciones de cada variable es igual o superior a 6 (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de clasificación de la AR.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN	
ACR 1987	ACR/EULAR 2010
<p>1. Rigidez matutina*</p>	<p>1. Afectación articular: 1 articulación grande: 0 puntos 2-10 articulaciones grandes: 1 punto 1-3 articulaciones pequeñas: 2 puntos 4-10 articulaciones pequeñas: 3 puntos > 10 articulaciones pequeñas: 5 puntos</p>
<p>2. Artritis en 3 o más articulaciones*</p>	<p>2. Serología: FR y / o ACPA negativos: 0 puntos FR y / o ACPA positivos bajos: 2 puntos FR y / o ACPA positivos altos: 3 puntos</p>
<p>3. Artritis en la mano*</p>	<p>3. Reactantes de fase aguda: PCR o VSG normales: 0 puntos PCR o VSG elevadas: 1 puntos</p>
<p>4. Artritis simétrica*</p>	<p>4. Duración de los síntomas: < 6 semanas: 0 puntos > 6 semanas: 1 punto</p>
<p>5. Presencia de nódulos reumatoides</p>	
<p>6. Positividad para el FR</p>	
<p>7. Cambios radiográficos</p>	
<p>*durante al menos 6 semanas.</p>	
<p>≥ 4 criterios para clasificar con AR.</p>	<p>Puntuación ≥ 6 puntos para clasificar con AR</p>

Respecto a los criterios de 1987, en los del 2010 se elimina la valoración de las características típicas de la AR establecida, como la presencia de nódulos reumatoides o los cambios radiográficos típicos de la enfermedad, como las erosiones o la osteoporosis¹⁹⁸. Sin embargo, en los criterios del 2010 se incorporan o se incrementa el peso de las características que están presentes en fases tempranas de la AR, como los marcadores serológicos y los reactantes de fase aguda¹⁹⁸. En relación a los marcadores serológicos, además de valorar la presencia del FR, los criterios ACR/EULAR 2010 introducen por primera vez la presencia de los ACPA. Los criterios incluyen una nueva variable cuya puntuación depende de la presencia del FR y / o los ACPA¹⁹⁸. Esta puntuación no solo depende de la presencia o ausencia de estos anticuerpos, sino que también tiene en cuenta el título de ambos marcadores. Los títulos del FR o los ACPA iguales o superiores a 3 veces el límite superior de la normalidad son

considerados como títulos altos, y los que son solo superiores al límite de la normalidad como títulos bajos. La puntuación de esta variable es 0 si el paciente es negativo para ambos anticuerpos, 2 si el paciente es positivo para el FR o los ACPA con títulos bajos, y 3 si es positivo para uno o para los dos pero con títulos altos¹⁹⁸.

El peso de los autoanticuerpos en los criterios de clasificación del 2010 está justificado por los niveles de sensibilidad y especificidad que los ACPA y el FR muestran para la AR. Los ACPA tienen una sensibilidad del 67 % (IC 95 %: 62 -72) y una especificidad del 95 % (IC 95 %: 94 - 97), y el FR presenta una sensibilidad del 69 % (IC 95 %: 65 - 73) y una especificidad del 85 % (IC 95%: 82 - 88)²⁰⁰. La sensibilidad es similar para los dos anticuerpos, aunque por su mayor nivel de especificidad, los ACPA se presentan como mejores biomarcadores para la clasificación de la AR⁵⁰. Los estudios realizados en cohortes de EA también reflejan el valor que tienen los ACPA y el FR en los criterios de clasificación del 2010. Los estudios longitudinales realizados en las clínicas de EA son de gran importancia, ya que permiten valorar la capacidad que tiene un marcador para clasificar como AR a los pacientes con EA de forma correcta. Además, volviendo a lo mencionado en el apartado anterior, esta clasificación precoz de la AR permitiría dirigir el tratamiento de forma adecuada y evitar el daño a largo plazo. En estos estudios, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) son las estimaciones que suelen utilizarse para valorar la capacidad clasificatoria del marcador. Los ACPA muestran un VPP del 94 % y un VPN del 64 - 89 %^{77,201-203}. Para el FR las estimaciones son del 69 - 86 % y 69 - 88 %, respectivamente^{77,201-203}.

Respecto a los criterios ACR 1987, los nuevos criterios de clasificación del 2010 han conseguido aumentar la sensibilidad diagnóstica de la enfermedad a expensas de una pequeña disminución en la especificidad (71 % vs. 82 % y 65 % vs. 61 %, respectivamente)^{204,205}. Sin embargo, todavía hay posibilidad de mejorar^{206,207}, y por este motivo se ha considerado la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de los pacientes. Hay dos estudios realizados en pacientes con EA que valoran el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR. En estos trabajos no solo se ha estudiado la capacidad clasificatoria de los anticuerpos anti-CarP, sino que esta capacidad también se ha comparado con la del FR y los ACPA para estimar su contribución en la clasificación sobre el resto de autoanticuerpos.

En el trabajo de *Shi J y col.* los pacientes procedentes de la cohorte de EA de Leiden se siguieron durante dos años¹⁴⁴. El segundo estudio publicado por *Juarez M y col.* incluyó a pacientes con EA procedentes del Reino Unido que recibieron un seguimiento de 18 meses⁷⁷. Los anticuerpos anti-CarP presentaron en los dos trabajos valores de especificidad elevados, similares a los del FR y los ACPA (Tabla 4). Sin embargo, su sensibilidad fue claramente inferior a la del resto de autoanticuerpos, con unas estimaciones del 35 – 44 % (Tabla 4). Las estimaciones realizadas en el grupo de pacientes ACPA negativos resultan más interesantes. La ausencia de estos anticuerpos complica la clasificación de la enfermedad, lo que hace que sea todo un reto el encontrar nuevos biomarcadores que permitan mejorar la clasificación y el manejo de los pacientes ACPA negativos. En los trabajos mencionados la sensibilidad de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes ACPA negativos fue bastante mediocre, con valores de tan solo el 12 y 4 % en las cohortes de Leiden y Reino Unido, respectivamente (Tabla 4). Las estimaciones de los valores predictivos dieron resultados similares. El VPN de los anticuerpos anti-CarP fue similar al del resto de autoanticuerpos, mientras que el VPP fue claramente inferior al de los ACPA y el FR (Tabla 4). En el subgrupo de pacientes ACPA negativos estos valores fueron más bajos, con un VPN del 71 – 76 % y un VPP del 37 – 17 % (Tabla 4).

La contribución de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación sobre el resto de autoanticuerpos también fue valorada por *Verhuel MK y col.*²⁰⁸. Los autores de este trabajo seleccionaron un total de 11 poblaciones, 8 de pacientes con AR y 3 de pacientes en fases tempranas, y realizaron un meta-análisis combinando los datos para los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP de cada población. Además de confirmar los resultados mencionados en el párrafo anterior, *Verhuel MK y col.* encontraron un dato interesante. La combinación de los anticuerpos anti-CarP con la presencia de los ACPA y el FR supuso un incremento notable en la especificidad. Este incremento en especificidad fue llamativo únicamente al combinar los anticuerpos anti-CarP con la presencia concordante de los ACPA y el FR. Como resultado, con la triple positividad se consiguió una especificidad de hasta el 100 %. En las cohortes de pacientes en fases tempranas la triple positividad también mostró una asociación más fuerte con el desarrollo de la AR, tanto en comparación con la presencia de dos anticuerpos, de uno, o de la combinación de los ACPA o el FR.

Tabla 4. Parámetros utilizados para evaluar el valor de los autoanticuerpos en la clasificación de los pacientes. En la tabla se muestran los resultados del trabajo de Shi J y col. y Jurez M y col. S: Sensibilidad, E: Especificidad.

		<i>Shi J y col.</i>	<i>Jurez M y col.</i>
Todos los pacientes	Anti-CarP		
	<i>S</i>	44	35
	<i>E</i>	89	94
	<i>VPP</i>	78	78
	<i>VPN</i>	65	76
	ACPA		
	<i>S</i>	54	48
	<i>E</i>	96	98
	<i>VPP</i>	94	94
	<i>VPN</i>	64	76
	FR		
	<i>S</i>	59	56
<i>E</i>	91	92	
<i>VPP</i>	86	81	
<i>VPN</i>	72	77	
ACPA negativos	Anti-CarP		
	<i>S</i>	12	4
	<i>E</i>	91	94
	<i>VPP</i>	37	17
	<i>VPN</i>	71	76

Los resultados comentados cuestionan la utilidad de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR. La sensibilidad de los anticuerpos anti-CarP es inferior a la del resto de autoanticuerpos, y su contribución no mejora la clasificación conseguida por los ACPA y el FR. Uno de los objetivos de este proyecto consistió en valorar el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de los pacientes. Los resultados, que ya han sido publicados (Anexo 2), serán comentados y discutidos posteriormente. En el momento en el que nos planteamos esta cuestión no estaba tan claro cuál era el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación, y parecía posible que pudiesen tener algún tipo de aportación. Actualmente sabemos que los anticuerpos anti-CarP no mejoran la clasificación de la AR, ni en el conjunto global de pacientes ni el grupo de pacientes seronegativos. En este punto es importante tener en cuenta que el peso de los ACPA y el FR en los criterios ACR/EULAR 2010 junto con la frecuente concordancia entre autoanticuerpos, hace que sea difícil encontrar un nuevo anticuerpo que permita mejorar los criterios de clasificación²⁰⁹. De esta forma, quizás sea más razonable buscar otro tipo de biomarcadores serológicos para mejorar la clasificación de los

pacientes. Aun así, los hallazgos del trabajo de *Verhuel MK y col.* no se pueden pasar por alto. Los resultados de este trabajo indican que la concordancia de autoanticuerpos tiene un papel importante en la clasificación, algo que empuja a investigar las mejoras que supondría la triple positividad en los criterios de clasificación actuales.

2.1.6 Posibles antígenos carbamilados.

La principal incógnita acerca de los anticuerpos anti-CarP es que no se conocen los antígenos carbamilados específicos reconocidos por estos anticuerpos. Desde su descubrimiento en el año 2011¹ se han propuesto diferentes candidatos, aunque ninguno se puede considerar confirmado. Además, los candidatos se han propuesto bien por ser antígenos específicos de los ACPA o bien por ser proteínas presentes en el FBS, pero no por haber sido identificados como antígenos carbamilados reconocidos por los anticuerpos anti-CarP en los tejidos de los pacientes con AR.

Tabla 5. Proteínas propuestas como posibles antígenos carbamilados. GRP78: proteína reguladora de glucosa 78, A1AT: α -1-antitripsina.

Candidato propuesto	Motivo de la selección	Ref.
Fibrinógeno	antígeno citrulinado	210
Vimentina	antígeno citrulinado	37
α -enolasa	antígeno citrulinado	38
GRP78	antígeno citrulinado	211
Albúmina	proteína del FBS	212
A1AT	proteína del FBS	213

El fibrinógeno ha sido uno de los antígenos carbamilados propuestos, por ser una de las proteínas citrulinadas reconocidas por los ACPA²¹⁴. En varios trabajos el fibrinógeno carbamilado *in vitro* se utilizó como antígeno para detectar la reactividad de los anticuerpos anti-CarP, mostrando un porcentaje de positividad similar al porcentaje frente al FBS carbamilado^{1,25,73}. La reactividad de los anticuerpos anti-CarP frente al fibrinógeno se analizó más detalladamente en el trabajo publicado por *Jones DJ y col.*²¹⁰. Estos autores iniciaron su trabajo a partir del suero de un paciente con AR que mostró reactividad frente al fibrinógeno carbamilado, y más específicamente frente a la cadena β de la proteína²¹⁰. Mediante espectrometría de masas (MS), *Jones DJ y col.* encontraron que 9 de las 34 lisinas de la

cadena β estaban carbamiladas. Utilizando péptidos sintéticos carbamilados en alguna de esas 9 lisinas, identificaron hasta un 35 % de reactividad frente a alguno de los péptidos²¹⁰. El trabajo de *Jones DJ y col.* definió un poco más la reactividad de los anticuerpos anti-CarP frente al fibrinógeno, atribuyendo esta reactividad a la cadena β de esta proteína. Sin embargo, no se ha identificado la presencia de fibrinógeno carbamilado en los tejidos de los pacientes con la enfermedad, ni se han realizado experimentos que demuestren que la reactividad observada en el suero es específica del fibrinógeno y no atribuible a reactividad cruzada.

La α -enolasa³⁸, la vimentina³⁷ y la proteína reguladora de glucosa 78 (GRP78)²¹¹ también se han considerado como posibles antígenos carbamilados, por ser proteínas citrulinadas reconocidas por los ACPA^{215,216}. La reactividad frente a estos 3 candidatos se ha determinado a partir de proteínas comerciales carbamiladas *in vitro*. Por lo tanto, al igual que lo ocurrido con el fibrinógeno, no se ha tenido en cuenta si la α -enolasa, la vimentina o la GRP78 están carbamiladas en las muestras de tejido articular de los pacientes con AR, ni se ha demostrado la especificidad del reconocimiento por los anticuerpos en relación con otras proteínas carbamiladas. Así, por ejemplo, no se ha analizado la reactividad de los anticuerpos anti-fibrinógeno carbamilado con la enolasa, la vimentina o la GRP78 carbamiladas.

Otros autores han tratado de identificar los antígenos carbamilados en la mezcla de proteínas que componen el FBS carbamilado *in vitro*, por ser este conjunto proteico el utilizado en la mayoría de los estudios para determinar la reactividad de los anticuerpos anti-CarP. La albúmina fue identificada mediante MS por *Nakabo S y col.* como la principal proteína reconocida por los anticuerpos anti-CarP en el FBS²¹². Utilizando albúmina carbamilada *in vitro*, estos autores encontraron al 31.4 % de los pacientes positivos. Aunque se han identificado péptidos carbamilados derivados de la albúmina en tejido sinovial de pacientes con AR²¹⁷, no se puede afirmar que *Nakabo S y col.* hayan identificado un antígeno endógeno reconocido por los anticuerpos anti-CarP. Hay que tener en cuenta que *Nakabo S y col.* no utilizaron muestras procedentes de tejido de pacientes con AR, sino que parten del FBS, una mezcla proteica que ni siquiera es de origen humano. Además, una vez que identifican a la albúmina como un posible candidato, estudian la reactividad de los anticuerpos anti-CarP frente a albúmina comercial carbamilada *in vitro*, pero en ningún momento identifican reactividad de los anticuerpos anti-CarP frente a albúmina endógena

carbamilada en los pacientes con AR. En contraste con el trabajo anterior, *Verhuel MK y col.* identificaron por MS a la α -1-antitripsina (A1AT) como la principal proteína reconocida por los anticuerpos anti-CarP en el FBS²¹³. Utilizando A1AT carbamilada *in vitro* *Verhuel MK y col.* encontraron una positividad del 35 %. A diferencia del trabajo de *Nakabo S y col.*, en este estudio los autores identificaron en fluido sinovial un péptido carbamilado de la A1AT. Sin embargo, en la identificación del péptido solo utilizaron la muestra de un único paciente con AR. De nuevo nos encontramos con una situación que no confirma a ningún antígeno endógeno reconocido por los anticuerpos anti-CarP. Al igual que *Nakabo S y col.*, en el estudio de *Verhuel MK y col.* se parte de una mezcla proteica no humana y la reactividad se estudia utilizando una proteína comercial carbamilada en el laboratorio. La identificación del péptido derivado de la A1AT en el fluido sinovial aproxima los resultados hacia una situación más real. Sin embargo, es necesario tanto identificar el péptido de la A1AT en un número mayor de muestras, como determinar si los anticuerpos anti-CarP de los pacientes con AR reconocen el péptido identificado en el tejido articular. Además, en ninguno de estos dos trabajos comentados se ha comprobado si la reactividad frente la albúmina o la A1AT carbamiladas es específica o si es consecuencia de reactividad cruzada.

El análisis sobre la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CarP es esencial. Sin este tipo de análisis, no se puede confirmar que la reactividad frente a los candidatos mencionados sea específica. La reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CarP se analizó en el trabajo publicado por *Dekkers JS y col.* Los autores utilizaron como fuente de antígeno distintas proteínas carbamiladas (FBS, albúmina humana, albúmina murina, proteína básica de mielina, ovoalbúmina, protrombina e histona H1) y analizaron la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CarP mediante ensayos de inhibición. Los anticuerpos anti-CarP mostraron reactividad cruzada frente a todos los antígenos incluidos, reflejando que quizás sea más importante el residuo carbamilado que la proteína específica que contenga ese residuo.

Es importante tener en cuenta que esta reactividad cruzada no excluye que haya antígenos endógenos relevantes. Además de la albúmina²¹⁷ y el péptido de la A1AT²¹³, el colágeno, la proteína SRPX2, la fibronectina y la fibromodulina son otras proteínas carbamiladas identificadas en el tejido articular de los pacientes con AR²¹⁷. La presencia de proteínas carbamiladas indica que la carbamilación en los pacientes con AR es posible, y estimula el interés por identificar a los antígenos endógenos reconocidos por los anticuerpos anti-CarP.

Estas investigaciones son importantes, ya que la identificación de estos antígenos resulta fundamental para definir mucho mejor el papel que tienen los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con AR. Un buen punto de partida sería estudiar la reactividad de los anticuerpos anti-CarP sobre muestras de tejido articular procedente de los pacientes con la enfermedad. La presencia de reactividad sobre este tejido llevaría a identificar los antígenos endógenos que son reconocidos en los pacientes por los anticuerpos anti-CarP.

2.1.7 Carbamilación de proteínas en la artritis reumatoide.

La identificación de proteínas carbamiladas en el tejido articular plantea la cuestión sobre los mecanismos responsables de la carbamilación de proteínas en la AR. A pesar del desconocimiento acerca de los antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos anti-CarP, en la AR se han descrito una serie de mecanismos que podrían favorecer la carbamilación de proteínas e iniciar este tipo de respuesta inmune.

El tabaco es uno de los mecanismos relacionados con la carbamilación de proteínas que podría participar en la AR. Como se ha mencionado en anteriores apartados, el isocianato inhalado con el tabaco puede ser utilizado por la MPO para formar cianato. El incremento en los niveles de cianato podría favorecer la carbamilación e incrementar los niveles de proteínas carbamiladas⁶. También se ha comentado que en la AR existe un modelo patogénico en donde el tabaquismo es el responsable de favorecer la citrulinación de proteínas a nivel pulmonar. De forma similar, se podría pensar en un modelo en el que el tabaco estimulase la carbamilación en el pulmón de los pacientes con AR. Si bien es cierto que esto es solo una hipótesis, ya que no hay ninguna evidencia que correlacione el hábito fumador con el incremento de carbamilación en los pacientes con AR.

La MPO es una enzima expresada en los neutrófilos que puede ser liberada al exterior tras la activación de este tipo celular, creando un ambiente favorecedor para la carbamilación^{6,7}. La MPO liberada al exterior tras esta activación forma parte de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Las NETs son mallas de ADN que engloban histonas y otras proteínas, y que son liberadas al medio extracelular por los neutrófilos activados mediante un proceso conocido como NETosis²¹⁸. Los neutrófilos utilizan este mecanismo en respuesta a patógenos, para capturar e eliminar mediante fagocitosis a los microorganismos²¹⁸. Sin embargo, la

activación descontrolada de la NETosis se ha visto que tiene un papel patogénico en algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la AR²¹⁸. Así, la MPO liberada en las NETs podría favorecer la carbamilación de proteínas en estas patologías al incrementar los niveles de cianato, idea que ha sido apoyada por *Skopelja S y col.*, quienes encontraron presencia de proteínas carbamiladas en las NETs³⁶. De esta forma, sería razonable que los neutrófilos del tejido articular de los pacientes con AR se activasen en respuesta a la inflamación y liberasen MPO al exterior, favoreciendo la formación de proteínas carbamiladas en esta localización. Esta hipótesis está apoyada por la generación de proteínas citrulinadas a partir de la enzima PAD que es liberada en las NETs tras la activación de los neutrófilos^{219,220}. Además, algunas de estas proteínas citrulinadas son antígenos reconocidos por los ACPA^{219,220}, algo que permite pensar en la posibilidad de que las proteínas carbamiladas formadas en la NETosis pudiesen actuar como antígenos de los anticuerpos anti-CarP²²¹. La relación de la MPO con la carbamilación de proteínas en la AR también ha sido propuesta por *Turunen S y col.*²²². Estos autores encontraron niveles de carbamilación incrementados en muestras de sinovia y de nódulos reumatoides procedentes de pacientes con la enfermedad. En su trabajo los niveles de carbamilación mostraron una correlación significativa con la expresión de la MPO en estas localizaciones, proponiendo de nuevo la posibilidad de que este enzima sea la responsable de generar autoantígenos carbamilados en la enfermedad.

Otro mecanismo relacionado con la carbamilación que podría participar en la AR es la autofagia de los fibroblastos sinoviales. Esta idea ha sido propuesta en el estudio de *Manganelli V y col.*, donde la carbamilación de proteínas mostró un incremento con la autofagia de los fibroblastos sinoviales²²³, que son un tipo celular importante en la patogenia de la enfermedad²²⁴. Además de este resultado *in vitro*, *Manganelli V y col.* observaron una correlación significativa entre la autofagia de monocitos procedentes de pacientes con AR y la carbamilación²²³. Aunque los autores no dan una explicación sobre la relación entre la autofagia y la carbamilación, es posible que la MPO también pudiese estar actuando en este proceso. De todos modos, el trabajo de *Manganelli V y col.* es el único en el que se ha propuesto esta relación entre la autofagia y la carbamilación en la AR, y por lo tanto, es una idea que todavía está sujeta a futuras investigaciones.

El tabaquismo, la actividad de la MPO, la NETosis o la autofagia son mecanismos que pueden participar en la carbamilación de proteínas de la AR. Sin embargo, se desconoce si alguno de estos mecanismos está detrás de la formación de los antígenos carbamilados reconocidos por los anticuerpos anti-CarP. Hasta el momento solo es posible el planteamiento de hipótesis, ya que ninguna idea ha sido todavía demostrada. La identificación de los antígenos carbamilados debería tener en cuenta a estos mecanismos, y quizás una buena idea sería tratar de identificar los antígenos endógenos en muestras de tejido pulmonar de pacientes con AR, en las NETs de neutrófilos procedentes de pacientes o bien en los fibroblastos autofágicos del tejido articular.

2.2 Anticuerpos anti-proteínas carbamiladas en otras enfermedades.

Los anticuerpos anti-CarP se han estudiado en otras enfermedades reumáticas, aunque el porcentaje de positivos descrito es inferior al de la AR. El LES y el síndrome de Sjögren (SS) son las dos enfermedades en las que la repercusión de los anticuerpos anti-CarP ha sido mayor. En relación con el LES hay cuatro estudios que han estudiado la prevalencia de los anticuerpos anti-CarP en esta patología. Uno de los trabajos encontró un porcentaje de pacientes positivos bastante prometedor, del 28.3 %²²⁵. Sin embargo, en los 3 trabajos restantes la frecuencia de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes lúpicos fue bastante baja, sin apenas pasar del 10 %^{33,35,226}. Más interesante es la asociación descrita entre los anticuerpos anti-CarP y la presencia de artropatías en los pacientes con LES. Dentro de las posibles artropatías es importante distinguir entre la artritis no erosiva y la erosiva, ya que en el LES la no erosiva es la más común. Esta asociación se encontró en el trabajo de *Massaro L y col.*²²⁶. En su estudio se incluyeron a 76 pacientes lúpicos con artropatías (presencia de artralgia o artritis), de los que el 43.6 % fueron anti-CarP positivos. También analizaron la relación entre los anticuerpos anti-CarP y la presencia de artritis erosiva en una articulación utilizando a 15 pacientes que presentaron este fenotipo. Los anticuerpos anti-CarP mostraron una asociación significativa con este tipo de artritis, presentando un porcentaje de positividad del 63.1 % en los pacientes con artritis erosiva frente al 41.2 % de positividad en los demás pacientes con otras artropatías. La relación entre los anticuerpos anti-CarP y la artritis erosiva en el LES se encontró en otros dos estudios. En el trabajo de *Ziegelsch M y col.* el 10 % de los pacientes lúpicos incluidos presentó artritis erosiva, y en ellos los anticuerpos anti-CarP mostraron una asociación significativa con este tipo de artropatía³³. Por último, la presencia

de artritis erosiva también fue mayor en los pacientes con LES anti-CarP positivos que en los negativos del estudio publicado por *Ceccarelli F y col.*²²⁵. Aunque hay varios trabajos que han estudiado a los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con LES, todavía no está claro cuál es el papel que pueden tener estos anticuerpos en esta patología, ni cuál es la contribución que tienen los anticuerpos anti-CarP sobre otros autoanticuerpos característicos de esta enfermedad. Al margen del LES, la frecuencia de los anticuerpos anti-CarP en el SS se ha descrito en tres trabajos que muestran una prevalencia del 27-38 % para estos anticuerpos^{28,30,32}. Además, uno de los trabajos sugiere la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores de enfermedad más grave. Así, los pacientes positivos del estudio de *Bergum B y col.* presentaron una mayor sequedad oral, una mayor infiltración linfocitaria, y un mayor número de estructuras similares a centro germinales en las glándulas salivares³².

Además del LES y el SS, los anticuerpos anti-CarP se han estudiado en otras enfermedades reumáticas como la espondiloartritis, el síndrome de Behçet, el síndrome de Still del adulto, la polimialgia reumática o la dermatomiositis. Sin embargo, en todas ellas el porcentaje de positividad descrito es bajo (inferior al 10 %) o bien el número de muestras estudiado es insuficiente para obtener resultados válidos^{28,30}. Únicamente en la artritis idiopática juvenil (AIJ), *Moore TL y col.* encontraron al 20 % de los pacientes con AIJ positivos para los anticuerpos anti-CarP²²⁷. Aunque estos resultados contrastan con los de *Muller PC y col.*, en cuyo trabajo se describe un porcentaje de positividad de tan solo el 8 %³⁴. Tampoco parece que los anticuerpos anti-CarP presenten un papel importante en la patogenia de estas enfermedades. Si bien es cierto que *Favoino E y col.* encontraron una asociación entre los anticuerpos anti-CarP y las lesiones de la piel de los pacientes con esclerosis sistémica³¹. Sin embargo, en este último trabajo los títulos de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con la enfermedad no fueron diferentes de los títulos de los sujetos sanos utilizados como control³¹.

La especificidad de los anticuerpos anti-CarP es alta para la AR cuando los pacientes se comparan con sujetos sanos o sin enfermedades reumáticas, dado que la prevalencia de estos anticuerpos en este último grupo es baja, entre el 2 y el 4 %^{28,30}. Sin embargo, la especificidad se puede ver reducida al realizar la comparación con pacientes que presenten otras enfermedades reumáticas distintas a la AR. Esto es algo que ocurre con frecuencia en el contexto de las consultas de EA. El clínico puede clasificar a estos pacientes con AR o con

otras enfermedades reumáticas como las mencionadas en este apartado. De esta forma, la especificidad diagnóstica de los anticuerpos anti-CarP para la AR de las consultas de EA disminuye, aunque su presencia sea más baja en enfermedades como el LES, el SS o la polimialgia reumática.

La identificación de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con AR ha resultado muy prometedora. Desde su descubrimiento en el año 2011 distintos estudios han ido juntando las piezas necesarias para definir el papel de los anticuerpos anti-CarP en la enfermedad. Sin embargo, el puzzle no está completo ya que todavía hay una serie de cuestiones que continúan sin resolverse. Cuando se comenzó a realizar este proyecto, una de las principales cuestiones consistía en conocer el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de los pacientes. Actualmente, sabemos que el uso de los anticuerpos anti-CarP no mejora la clasificación. Esta asunción se ha conseguido tanto gracias a uno de los trabajos que forman parte de esta tesis como a estudios publicados posteriormente por otros autores. Otras cuestiones todavía no descifradas incluyen a los factores etiológicos ambientales y genéticos asociados con los anticuerpos anti-CarP, a la relación entre estos anticuerpos y la pérdida ósea generalizada de los pacientes con AR, a la aportación de la concordancia entre los anticuerpos anti-CarP, el FR y los ACPA en los criterios de clasificación, y a la contribución de los anticuerpos anti-CarP sobre la gravedad de la enfermedad y su utilidad como biomarcadores pronósticos de la AR. Todas estas cuestiones se abordarán a lo largo de este proyecto y serán presentadas en el contexto de publicaciones, ya que la mayoría de los resultados de la tesis están ya publicados o enviados en proceso de revisión.





OBJETIVOS



OBJETIVOS

1. Identificar los alelos del HLA que se asocian con el riesgo de tener AR con anticuerpos anti-CarP.
2. Analizar la relación del tabaquismo con la susceptibilidad a los subtipos de AR definidos por la presencia de los anticuerpos específicos: ACPA, FR y anticuerpos anti-CarP, ya que la introducción de estos últimos sugiere nuevas asociaciones.
3. Determinar si los anticuerpos anti-CarP pueden ser de utilidad para la clasificación de los pacientes con AR en consultas de EA, ya sea considerados individualmente o en combinación con otros autoanticuerpos.
4. Estudiar la asociación de los anticuerpos anti-CarP con el grado de actividad y de incapacidad funcional de los pacientes con EA, determinando si esta relación es independiente a la del resto de autoanticuerpos, y si se mantiene a lo largo de la evolución de la enfermedad de los pacientes.
5. Analizar si la presencia de los anticuerpos anti-CarP se asocia de forma específica con la pérdida ósea sistémica propia de la AR, considerando la relación entre estos anticuerpos y la DMO en pacientes con EA.





MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES.

Los experimentos de este proyecto se han realizado utilizando sueros procedentes de pacientes con EA, de pacientes con AR establecida y de controles sanos. Los pacientes con EA incluidos proceden de la cohorte de EA del Hospital de La Paz¹¹⁷ (nombrada en este estudio como IDIPAZ) y del registro longitudinal de artritis temprana del Hospital Universitario La Princesa (PEARL)¹¹⁸. Los sueros de pacientes con AR establecida proceden del Hospital Clínico Universitario de Santiago²⁶, del Hospital Universitario Marqués del Valdecilla²²⁸ y del Hospital Clínico San Carlos²²⁹. En este proyecto se refiere a ellas como IDIS, IDIVAL e IdISSC, respectivamente. Por último, las muestras de controles sanos utilizadas se recogieron en el Hospital Clínico Universitario de Santiago. Además de los sueros, en los experimentos de este trabajo se han incluido los datos disponibles de los pacientes con AR procedentes de 2 cohortes suecas (*Better Anti-Rheumatic Farmaco-Therapy*, BARFOT²³⁰ y *Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*, EIRA²³¹), de una cohorte holandesa (*Leiden Early Arthritis Cohort*, Leiden EAC¹²³), de una cohorte procedente del Reino Unido (*Norfolk Arthritis Register*, NOAR²³²), y de una cohorte italiana³⁰ (nombrada en este estudio como Rome).

A continuación, se definen las distintas colecciones de muestras utilizadas. Para facilitar la comprensión de la tesis, en la Tabla 6 se especifican las colecciones y el número de muestras incluidas en los distintos estudios realizados. A lo largo de los resultados, se indicará con más detalle las características de los pacientes incluidos en cada uno de los estudios.

1.1 Muestras de pacientes con EA: IDIPAZ y PEARL.

Las cohortes IDIPAZ y PEARL incluyen a pacientes con EA reclutados de manera prospectiva en el Hospital Universitario La Paz y el Hospital Universitario La Princesa, respectivamente. Las dos cohortes incluyen a pacientes que no han sido tratados con FAMES y que presentan dos o más articulaciones inflamadas durante un periodo inferior a un año. En

las dos colecciones los pacientes reciben un seguimiento protocolizado durante al menos dos años, consistente en 4 o 5 visitas realizadas cada 6 meses durante este periodo de seguimiento.

El estudio sobre el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR incluyó 525 muestras de la cohorte IDIPAZ y 537 de la cohorte PEARL. Estos pacientes se seleccionaron por haber completado dos años de seguimiento y por presentar una muestra de suero de la consulta basal. En la cohorte IDIPAZ, los pacientes seleccionados se reclutaron entre enero de 1993 y diciembre de 2013, y en la cohorte PEARL entre julio de 2001 y diciembre de 2014. Los pacientes que además contaban con información del DAS28 de la consulta basal se utilizaron para estudiar la asociación entre los anticuerpos anti-CarP y el grado de actividad e incapacidad funcional de los pacientes con EA: en total 978 pacientes, de los que 492 procedieron de la cohorte IDIPAZ y 486 de la cohorte PEARL. Los estudios sobre la relación de los anticuerpos anti-CarP con la molécula HLA-DRB1 y con el tabaquismo incluyeron a aquellos que fueron clasificados con AR al final del seguimiento (n = 242 en la cohorte IDIPAZ y n = 256 en la cohorte PEARL). En la cohorte IDIPAZ, estos pacientes presentaron un 76.2 % de mujeres, una edad de inicio de los síntomas de 53 años, y un tiempo de evolución de la enfermedad de 4 semanas. En la cohorte PEARL, el porcentaje de mujeres fue del 82.4 %, la edad de inicio de 56 años, y el tiempo de evolución de 6 semanas. En ambas cohortes se utilizaron los criterios ACR de 1987 para clasificar como AR al final del seguimiento. Por último, para estudiar la relación entre los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de la DMO, se utilizaron los sueros y los datos de la consulta basal de 548 pacientes de la cohorte PEARL que presentaron muestra de suero basal y datos de densitometría ósea. Estos pacientes fueron reclutados desde febrero de 2002 hasta abril de 2017.

1.2 Muestras de pacientes con AR establecida: IDIS, IDIVAL e IdISSC.

Los pacientes con AR establecida se reclutaron de forma retrospectiva en el Hospital Clínico Universitario de Santiago (IDIS, n = 520), en el Hospital Clínico San Carlos (IdISSC, n = 628) y en el Hospital Clínico Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL, n = 459). En total 1607 pacientes clasificados con AR según los criterios de clasificación ACR de 1987. Los 520 pacientes de la cohorte IDIS presentan un tiempo de seguimiento de 14.4 años, un porcentaje de mujeres del 76.7 % y una edad de diagnóstico de 46.8 años. Los 625

procedentes de la cohorte IdISSC se caracterizan por presentar un porcentaje de mujeres del 74.1 %, un tiempo de seguimiento de 4.7 años y una edad de diagnóstico de 57.6 años. Los 459 de la cohorte IDIVAL presentan un tiempo de seguimiento de 6.2 años, una edad de diagnóstico de 52.7 años y un porcentaje de mujeres del 74.1 %.

En el estudio sobre la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la molécula HLA-DRB1 se incluyeron los pacientes de las cohortes IDIS e IdISSC. En el trabajo relacionado con el tabaquismo, se incluyeron los pacientes de estas dos cohortes y los procedentes de la cohorte IDIVAL.

1.3 Muestras de controles.

Los controles sanos reclutados en el Hospital Clínico Universitario de Santiago son sujetos que no muestran signos de AR, ni presentan otro tipo de enfermedad reumática ni autoinmune. Los sueros de 208 controles se utilizaron para establecer el punto de corte en el ELISA de los anticuerpos anti-CarP. La información de estos sujetos también se incluyó en el estudio sobre la relación entre los anticuerpos anti-CarP y la molécula HLA-DRB1. Estos 208 controles sanos seleccionados presentan una edad media de 69.5 años y un porcentaje de mujeres del 49.0 %.

1.4 Cohortes EIRA, EAC Leiden, BARFOT, NOAR y Rome.

Los análisis de este proyecto también incluyen los datos de 3899 pacientes procedentes de dos colecciones de artritis de inicio (EAC Leiden y NOAR), de dos colecciones de pacientes con AR reciente (EIRA y BARFOT) y de una colección de pacientes con AR establecida (Rome). Las cohortes EAC Leiden y NOAR incluyen a pacientes con EA reclutados de forma prospectiva desde 1993 y 1989, respectivamente. En la cohorte EAC Leiden los pacientes incluidos presentan al menos una articulación inflamada y una duración de los síntomas inferior a un año. En la cohorte NOAR los pacientes se seleccionan por presentar dos o más articulaciones inflamadas durante al menos 4 semanas y una duración de los síntomas inferior a dos años. Los datos utilizados en este proyecto de las cohortes EAC Leiden y NOAR proceden de pacientes clasificados con AR. En las dos colecciones esta clasificación se realizó utilizando los criterios de la ACR de 1987. Las cohortes suecas EIRA y BARFOT

incluyen a pacientes con AR que presentan una duración de los síntomas inferior a un año. En EIRA los pacientes presentan un rango de edad de 18-70 años y un porcentaje de mujeres de 72.4 %. En la cohorte BARFOT los pacientes incluidos tienen una edad de diagnóstico de 57.3 años y un porcentaje de mujeres del 63.9 %. Los criterios de clasificación ACR de 1987 se utilizaron en las dos colecciones para clasificar a los pacientes como AR. La cohorte italiana (Rome) incluye pacientes con AR establecida que presentan una duración de los síntomas de 8.9 años, una edad media de 55.4 años y un porcentaje de mujeres del 77.0 %. En esta cohorte se utilizaron los criterios ACR/EULAR 2010 para clasificar a los pacientes.

Los experimentos realizados en el trabajo sobre el tabaquismo incluyeron 2551 pacientes con AR procedentes de las cohortes EAC Leiden (n = 769), BARFOT (n = 795), NOAR (n = 678) y Rome (n = 309). Los experimentos del estudio de asociación entre los anticuerpos anti-CarP y la molécula HLA-DRB1 incluyeron 1348 y 715 pacientes con AR procedentes de las colecciones EIRA y EAC Leiden, respectivamente.

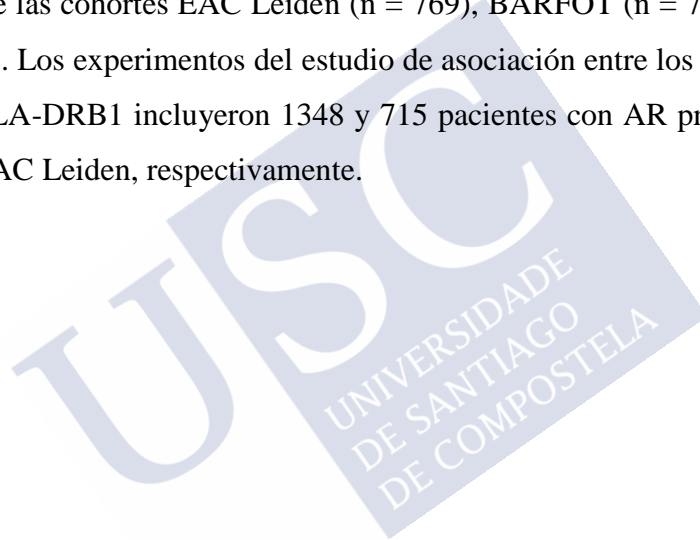


Tabla 6. Colecciones y número de muestras de pacientes utilizadas en los distintos estudios de esta tesis doctoral. HLA-DRB1: asociación de los anticuerpos anti-CarP con los alelos del HLA-DRB1 en los pacientes con AR, Tabaquismo: relación del tabaquismo con la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes con AR, Clasificación: valor predictivo de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con EA, y su contribución en la clasificación de los pacientes con AR, Actividad: asociación de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad de la enfermedad y una peor capacidad funcional con predominio en los más jóvenes, DMO: asociación de los anticuerpos anti-CarP con la disminución de la DMO en los pacientes con EA.

ESTUDIO	COHORTE									
	IDIPAZ ¹	PEARL ¹	IDIS ³	IDIVAL ³	IdISSC ³	EIRA ²	EAC Leiden ¹	BARFOT ²	NOAR ¹	Rome ³
HLA-DRB1	242	256	520	-	628	1348	715	-	-	-
Tabaquismo	242	256	470	459	508	-	769	795	678	309
Clasificación	525	537	-	-	-	-	-	-	-	-
Actividad	492	486	-	-	-	-	-	-	-	-
DMO	-	548	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Cohortes de pacientes con EA.

²Cohortes de pacientes con AR reciente.

³Cohortes de pacientes con AR establecida.

2. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido realizado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y al informe Belmont, y de acuerdo a ley biomédica española (Ley Española de Investigación Biomédica nº 14/2007). De esta forma, todas las muestras utilizadas se han obtenido con consentimiento informado y en el marco de proyectos cuyo protocolo ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia (nº 2014/387 y nº 2017/514).

3. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO CARBAMILADO.

Para detectar los anticuerpos anti-CarP mediante ELISA se utilizó como antígeno FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) carbamilado *in vitro*. La carbamilación de las proteínas del FBS se llevó a cabo mediante una incubación con cianato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). El FBS se diluyó en PBS 1x hasta alcanzar una concentración de 4 mg/mL, y el cianato fue añadido hasta una concentración final de 1M. Tras una incubación a 37°C durante 15 horas, el FBS carbamilado (CaFBS) se dializó con PBS 1x utilizando filtros para centrifugación con membranas de 4 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). El CaFBS se centrifugó a 14,000 x g durante 30 min a 4°C. El CaFBS recuperado en el filtro se diluyó con PBS 1x hasta una concentración de 2 mg/mL. Esta concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Paralelamente, se utilizó FBS nativo, no modificado, como control. Se siguió el mismo procedimiento para estas proteínas, pero incubando 4 mg/mL de FBS con cloruro potásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hasta una concentración final de 1M.

4. CONFIRMACIÓN DE LA CARBAMILACIÓN DEL FBS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

4.1 Hidrólisis de proteínas.

Paralelamente, 1 mg/mL de CaFBS y 1 mg/mL de FBS nativo fueron hidrolizados con ácido clorhídrico (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) a 110°C durante 18 horas. Las muestras hidrolizadas se filtraron utilizando una membrana de 0.2 µm (Merck Millipore,

Darmstadt, Germany), se resuspendieron en agua ultrapura (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) y se evaporaron a 37°C durante 24-48 horas. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 500 µL de citrato de litio pH 2.2 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. De nuevo, las muestras se resuspendieron en 200 µL de citrato de litio pH 2.2 y se filtraron utilizando una membrana de 0.2 µm (Pall Corporation, Port Washington, New York, USA). Finalmente, los aminoácidos libres hidrolizados del CaFBS y del FBS nativo se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4.2 Análisis de aminoácidos por HPLC.

Los aminoácidos hidrolizados del CaFBS y del FBS nativo se cuantificaron utilizando un analizador de aminoácidos *Biochrom 30* (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), con una columna de intercambio catiónico de alta resolución de 200 mm x 4.6 mm. Se añadieron 40 µl de L-Norleucina (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) como patrón interno en cada una de las muestras, y finalmente se cargaron 30 µL de cada hidrolizado en la cápsula de inyección. Como fase móvil se utilizaron soluciones tampón de citrato de litio de diferentes pH a un flujo de 25 mL/hr. La detección de los aminoácidos se realizó espectrofotométricamente a 570 nm, después de una derivatización post-columna con ninhidrina (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 135 °C, y la cuantificación de los mismos con el método del patrón interno con L-Norleucina. Por último, los cromatogramas fueron analizados utilizando el programa de procesamiento de datos EZChrom Elite (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Este procedimiento se realizó en el laboratorio de la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago, y ha sido acreditado (acreditación 1254/LE2308) por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) según la norma UNE-EN ISO 15189.

A partir de la concentración de la homocitrulina y la lisina en µmol/L se calculó el porcentaje de estos aminoácidos respecto a la cantidad total de aminoácidos en el CaFBS y FBS no modificado, respectivamente. La carbamilación de proteínas se verificó como el incremento en el porcentaje de la homocitrulina y disminución en el porcentaje de la lisina del CaFBS respecto al FBS nativo. Como ejemplo, en la figura 9 se muestran los cromatogramas

de una de las muestras utilizadas. Un porcentaje de homocitrulina del 5 % se consideró suficiente para detectar la reactividad de los anticuerpos anti-CarP en el ELISA.

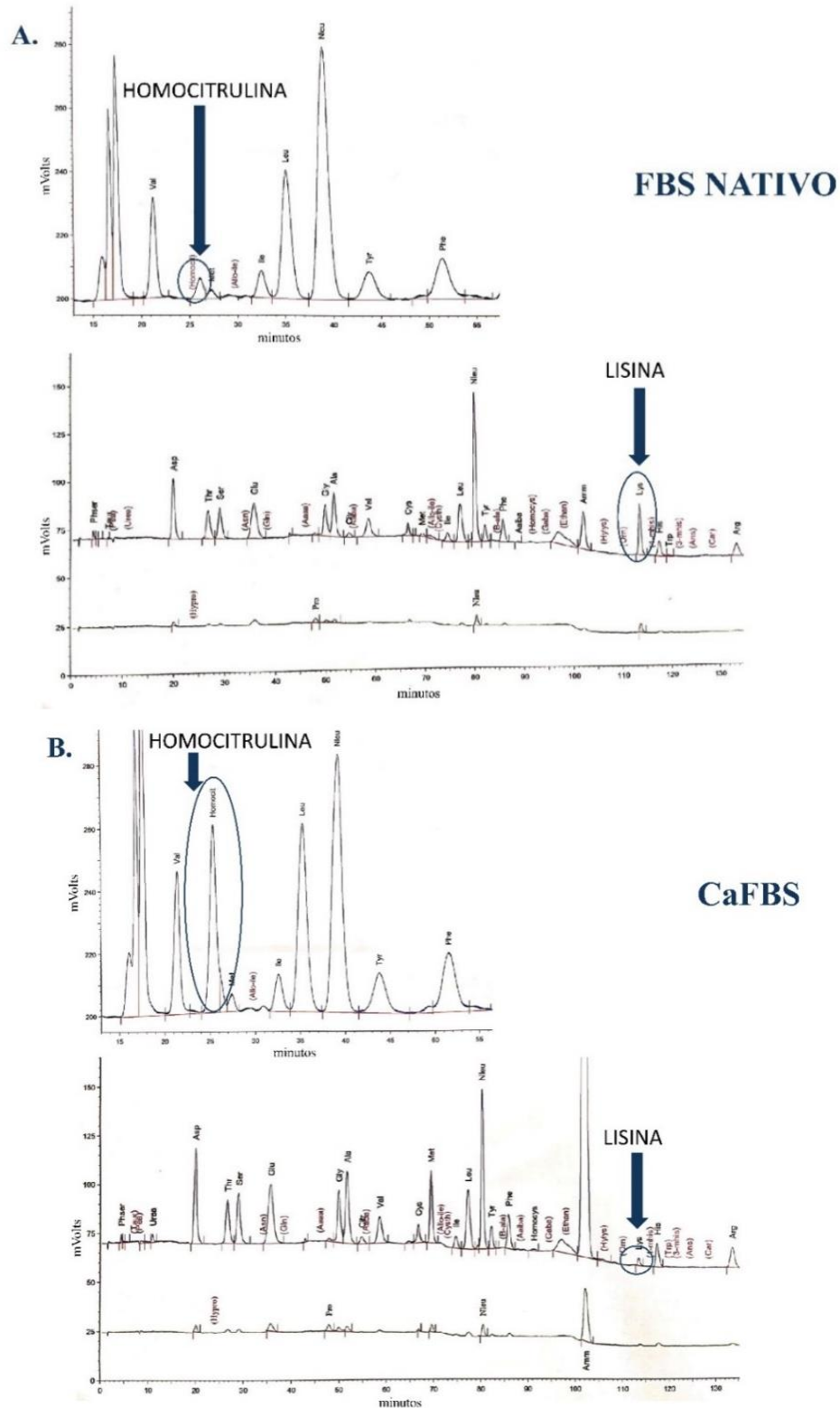


Figura 9. Cromatogramas. A) FBS nativo y B) FBS carbamylado. Se indica con una flecha los picos correspondientes a la homocitrulina y a la lisina en cada una de las muestras.

5. CUANTIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CARP EN SUERO.

Los anticuerpos anti-CarP presentes en el suero se cuantificaron mediante un ELISA casero. Se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), las cuales se recubrieron con 50 μ L por pocillo de CaFBS o de FBS no modificado a una concentración de 10 μ g/mL en tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6. Estas placas se incubaron a 4°C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces utilizando 200 μ L por pocillo de PBS 1x – Tween 20 0.05 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se bloquearon con 100 μ L por pocillo de PBS 1x – BSA 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) durante 6 horas a 4°C en agitación. Tras realizar otros 3 lavados, se añadieron 50 μ L por pocillo de cada uno de los sueros por duplicado previamente diluidos 1:50 en PBS 1x – Tween 20 0.05 % – BSA 1 % (PBT). En uno de los pocillos de cada una de las placas, se añadió PBT en lugar de suero (blanco) para determinar las uniones inespecíficas. Las placas se guardaron en una caja con hielo y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Después de realizar otros 3 lavados, en cada pocillo se añadieron 50 μ L de una dilución 1:5000 en PBT de anticuerpo anti-IgG humana (cadenas H+L y desarrollado en cabra) conjugado con fosfata alcalina (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridge, UK). Las placas se incubaron en una caja con hielo a 4°C durante 3 horas y media, se lavaron 3 veces y se incubaron con el sustrato de la fosfata alcalina para obtener la reacción colorimétrica. Se añadieron 100 μ L de p-Nitrofenil-fosfato preparado siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se utilizó el espectofotómetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para medir la absorbancia a 405 nm. En cada placa se utilizó un suero de un paciente con anticuerpos anti-CarP (control positivo) y un suero de un paciente sin anticuerpos (control negativo), y únicamente se aceptaron coeficientes de variación intraensayo e interensayo inferiores al 15 %. Para analizar la reactividad específica de los anticuerpos anti-CarP, la absorbancia frente al FBS no modificado fue sustraída de la absorbancia frente al CaFBS. Esta absorbancia fue transformada en unidades arbitrarias (UA) utilizando una curva estándar calculada a partir de nueve diluciones seriadas 1:1 de un pool de sueros de pacientes positivos para estos anticuerpos. Se utilizó la función exponencial para construir esta curva de referencia. La

concentración se expresó en UA/mL, y se consideró el percentil 98 % de los 208 controles como el punto de corte para determinar la positividad del paciente.

6. DETERMINACIÓN DE LOS ACPA Y EL FR EN SUERO.

Los datos de los ACPA y el FR se obtuvieron a partir de las determinaciones de estos autoanticuerpos en la práctica clínica diaria. En todos los hospitales, el isotipo IgM del FR se determinó por nefelometría. Se consideraron sueros positivos aquellos con valores superiores a 20 UA/mL. Los ACPA se cuantificaron por ELISA, utilizando ensayos diferentes en los distintos hospitales. Este tipo de pruebas utilizan como sustrato antigénico una mezcla de CCPs obtenidos de manera sintética. En el Hospital Clínico Universitario de Santiago y el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, se utilizaron ensayos de segunda generación (CCP2) con el kit EDIA™ anti-CCP assay (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden) (sueros positivos > 5 UA/mL). En las muestras del Hospital Clínico San Carlos, del Hospital Universitario La Paz y en las recogidas hasta octubre de 2010 del Hospital Universitario La Princesa, los ACPA se determinaron mediante ensayos CCP2 con el kit Immunoscan CCPlus® assay (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden) (sueros positivos > 50 UA/mL). En las muestras del Hospital Universitario La Princesa recogidas después de octubre de 2010, los ACPA se cuantificaron utilizando ensayos de tercera generación (CCP3) con el kit QUANTA Lite® CCP3.1 IgG/IgA (Inova Diagnostics, Inc. San Diego, California, USA) (sueros positivos > 40 UA/mL).

7. EVALUACIÓN DE LA DMO.

La DMO se cuantificó mediante absorciometría con rayos X de energía dual (DEXA) en la columna lumbar (CoL), la cadera total (CaT) y la mano. Todas las determinaciones se realizaron en el Hospital Universitario La Princesa, utilizando el equipo Hologic QDR-4500 Elite (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA). En la columna, la DMO se evaluó desde el 2º al 4º segmento lumbar; y en la mano no dominante, la determinación se realizó desde la 2ª a la 5ª articulación MCF (MCF). Los resultados del contenido mineral óseo se expresaron de forma absoluta o como puntuaciones Z. En el primer caso, la DMO se define en forma de gramos o miligramos de hidroxapatita por unidad de área proyectada por el hueso (g/cm^2 o mg/cm^2). En el segundo caso, las mediciones obtenidas en cada paciente se contrastan con

valores de referencia tomados en una población de la misma edad, sexo, origen étnico y peso. De esta forma, las puntuaciones *Z* se utilizaron para minimizar el efecto del sexo, la edad y el índice de masa corporal (IMC) sobre la DMO. Sin embargo, esta interpretación de los resultados solo fue posible en la CoL y la CaT, debido a la falta de una población de referencia para las articulaciones MCF.

8. TIPAJE DEL LOCUS *HLA-DRB1*.

La tipificación de los alelos del locus *HLA-DRB1* se realizó mediante diferentes métodos. Los métodos de menor resolución utilizados fueron de media resolución, que son los que permiten definir a los alelos con un código de 4 dígitos. Este nivel de media resolución fue el utilizado en los análisis y de esta forma, los alelos se representaron con cuatro campos numéricos delimitados entre sí por dos puntos. El primer campo describe el grupo del alelo, y el segundo campo indica la especificidad alélica.

En las muestras de la cohorte PEARL, de la cohorte IDIPAZ, y en 49 de las incluidas en la cohorte IdISSC, el tipaje se llevó a cabo combinando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP), y la tecnología Luminex (PCR-SSOP-Luminex). Así, siguiendo esta metodología, el genotipado de la molécula HLA implica cuatro etapas. En primer lugar, mediante la técnica de la PCR se amplifica el locus *HLA-DRB1* utilizando cebadores específicos biotinilados. Posteriormente, en una segunda fase, se hibridan los productos amplificados y biotinilados con las oligosondas específicas para cada uno de los alelos. Estas oligosondas contienen microesferas de poliestireno con dos colorantes fluorescentes a distintas concentraciones. La relación de las concentraciones de ambos colorantes es diferente en cada microesfera, y además es específica del oligonucleótido al que va unido. En una tercera etapa, los productos hibridados se incuban con la estreptavidina-ficoeritrina, que se une a los productos amplificados biotinilados. La última fase consiste en la medición de estos productos por citometría de flujo, mediante la cual un láser excita a la ficoeritrina unida al ADN, y otro a las microesferas. Este último emite una señal de fluorescencia determinada que identifica al oligonucleótido unido, y por lo tanto, al polimorfismo. Los resultados se analizan en un software que recoge las señales de fluorescencia y asigna el alelo que se corresponde con cada patrón emitido. La tipificación de la molécula HLA siguiendo esta metodología, se realizó utilizando el kit LABType SSO (One

Lambda Inc., Canoga Park, California, USA) en las muestras de la cohorte PEARL y de la cohorte IDIPAZ. El genotipado de la molécula HLA en estos pacientes se llevó a cabo en el Hospital Universitario La Princesa y el Hospital Universitario La Paz, respectivamente. El tipaje de las muestras de la cohorte IdISSC se realizó en el Hospital Clínico San Carlos con el kit Lifecodes HLA-SSO (Terpenel-Diagnostics Ltd., Abingdon, UK). En los tres hospitales se utilizó el analizador LABscan3D™ (One Lambda Inc., Canoga Park, California, USA) para detectar las señales de fluorescencia, y el software HLA Fusion 4.1 (One Lambda Inc., Canoga Park, California, USA) para la interpretación de los resultados.

El genotipado del locus *HLA-DRB1* en las restantes 579 muestras de la cohorte IdISSC se obtuvo mediante imputación de los resultados obtenidos con el ImmunoChip (Illumina, San Diego, California, USA). El ImmunoChip es un chip de ADN desarrollado por la plataforma Illumina, en el que se incluyen 196,524 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en 186 genes relacionados con la respuesta inmune. Dentro de todos estos polimorfismos, se incluye un conjunto de SNPs próximos a la región del complejo mayor de histocompatibilidad. En esta región se localizan los genes que codifican las diferentes moléculas del sistema HLA y, por lo tanto, es posible caracterizar los alelos del locus *HLA-DRB1* mediante imputación genética. Utilizando los datos del ImmunoChip de cada una de las muestras de la cohorte IdISSC, se imputaron los alelos del locus *HLA-DRB1* utilizando la herramienta SNP2HLA²³³ y los datos del Consorcio Internacional de Genética de la Diabetes Tipo 1²³⁴ como referencia.

En las muestras de la cohorte IDIS, el tipaje del HLA se realizó mediante secuenciación. Para ello se utilizó el kit AlleleSEQR HLA-DRB1 Typing Kit (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA), que permite amplificar en una única reacción de PCR todos los alelos del segundo exón del gen *HLA-DRB1* mediante una secuenciación bidireccional. La interpretación de los resultados se realizó con el software Assign-SBT 3.2.7 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA), para identificar los distintos alelos de cada una de las muestras. El tipaje de estas muestras ya se había realizado y publicado antes de la realización de esta tesis doctoral²³⁵.

Se consideró como EC a los 22 alelos codificantes para las secuencias QKRAA, QRRAA y RRRAA en las posiciones 70-74 de la cadena DRB1. Estos alelos se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de AA más comunes en las posiciones 70-74 de la cadena DRB1 de la molécula HLA. En la tabla se indican los distintos alelos codificantes para las diferentes secuencias de AA. En negrita se muestran los 22 alelos codificantes para las secuencias QKRAA, QRRAA y RRRAA, que han sido considerados como EC⁸⁵.

Secuencia de AA	EC	Alelos <i>HLA-DRB1</i> *
QKRAA	sí	*0401;*0409;*0413;*0416; *0421;*1419;*1421
DERAA	no	*0402;*0414;*0103;*1102;*1116;*1120;*1121; *1301;*1302;*1304;*1308;*1315;*1315;*1317; *1319;*1322;*1416
QRRAE	no	*0403;*0406;*0407;*0417;*0420
QRRAA	sí	*0101;*0102;*0105;*0404;*0405;*0408;*0410; *0419; *1402;*1406;*1409;*1413;*1417;*1420
RRRAA	sí	*1001
RRRAE	no	*09;*1401;*1404;*1405;*1407;*1408;*1410; *1411;*1414;*1418
DRRAA	no	*0415;*0805;*11011;*11012;*11041;*11042;*1105; *1106;*11081;*11082*1109;*1110;*1112;*1115;*1118; *1119;*1122;*1201;*12021;*12022;*12031;*12032;*1305; *1306;*1307;*1311;*1312;*1314;*1321;*1601;*1602;*1605
QARAA	no	*15;*1309
QKRGR	no	*03; *0422;*1107

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

9.1 Estadística descriptiva.

Las características cuantitativas de los pacientes se representaron utilizando la mediana y el rango intercuartílico (IQR). En cambio, las variables cualitativas se definieron a partir de los porcentajes (%). Las medias de las variables cuantitativas con distribución normal, se compararon mediante la prueba t de Student; y las variables que no siguieron esta distribución, con la prueba U de Mann-Whitney. Para las variables cualitativas se seleccionó la comparación de frecuencias con el test de chi-cuadrado. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), excepto en el trabajo acerca de la relación de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida de la DMO, donde se utilizó el programa Stata 13.0 (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA).

9.2 Análisis de correlación y concordancia.

Para conocer la relación entre los distintos anticuerpos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) y el coeficiente gamma de Goodman-Kruskal (γ). El primero se usó para conocer la correlación entre los títulos, y el segundo para determinar la concordancia en estado. Los valores de estos dos estadísticos varían entre -1 y +1, indicando una asociación negativa o positiva respectivamente. El coeficiente de Spearman también se utilizó para determinar la correlación entre la actividad de la enfermedad y la edad de los pacientes anti-CarP positivos y anti-CarP negativos. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

9.3 Evaluación de las pruebas diagnósticas.

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RV+) y razón de verosimilitud negativa (RV-), para conocer la contribución de cada anticuerpo en la clasificación de la AR (Figura 10. A). Estos parámetros se estimaron para cada uno de los anticuerpos por separado y para las combinaciones de *ACPA o FR*, *ACPA o FR o anti-CarP*, y *(ACPA o FR) y anti-CarP*.

Los valores de sensibilidad y especificidad se representaron gráficamente mediante una curva de la característica operativa del receptor (ROC)²³⁶. La curva ROC se obtiene representando la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) en las ordenadas y la tasa de los falsos positivos (1 – especificidad) en abscisas. Cuanto mayor es el desplazamiento de la curva hacia arriba y a la izquierda, mayor es la exactitud diagnóstica de la prueba. De esta forma, el área bajo la curva (AUC) puede utilizarse como un índice global de la exactitud del test. Este índice toma valores entre 1 y 0.5, y cuanto más próximo a 1 es el AUC, mejor es el método diagnóstico (Figura 10. B). Las curvas ROC se obtuvieron utilizando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), y los valores de AUC se calcularon para cada anticuerpo y para las distintas combinaciones.

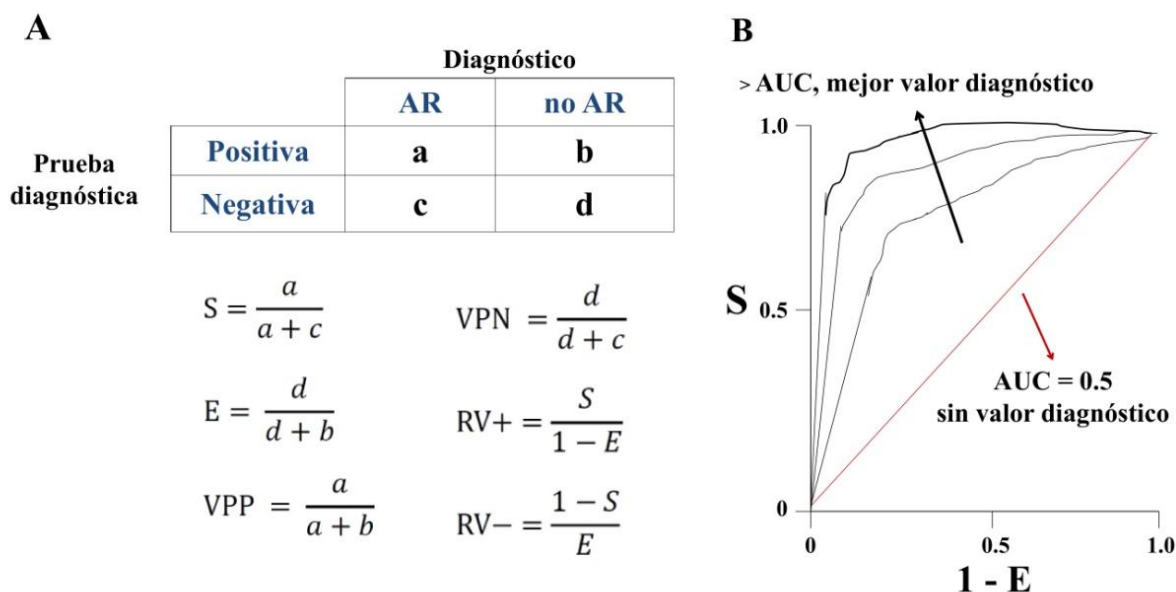


Figura 10. Índices utilizados para valorar una prueba diagnóstica. A) Fórmulas aplicadas para evaluar las pruebas diagnósticas (ACPA o FR, ACPA o FR o anti-CarP, y (ACPA o FR) y anti-CarP)²³⁶. B) Representación de una curva ROC. En rojo se muestra la diagonal que representa la peor situación posible, con un AUC de 0.5. La fecha negra indica como a medida que la curva se desplaza hacia arriba y hacia la izquierda, el valor de AUC aumenta, y así también el valor diagnóstico. S: sensibilidad, E: especificidad. Imagen de autoría propia.

9.4 Árboles de clasificación.

Se construyeron árboles utilizando el método de análisis de árboles de regresión y clasificación (CART)²³⁷, que es un método que permite predecir una variable observada a partir de un conjunto de variables explicativas. Con el método CART se genera una estructura resultante de la partición binaria recursiva del espacio de representación, que da lugar a una organización jerárquica en forma de árbol. El árbol se compone de un nodo raíz, que es el primer nivel del árbol, de diferentes nodos internos resultantes de la segmentación binaria, y de nodos terminales. A modo de ejemplo en la Figura 11 se muestra un esquema sencillo del árbol. A partir del nodo raíz, el método busca la variable más adecuada para partirlo en dos nodos internos utilizando una medida de pureza. La variable que consiga una mayor pureza se convierte en la utilizada en primer lugar, y así sucesivamente. El método CART utiliza una función de partición que asegura que la pureza en los nodos internos sea la máxima. Una de las funciones más utilizadas es la denominada Gini. El proceso de segmentación recursiva

continúa hasta que el árbol es saturado, es decir, hasta que no se pueda realizar una división adicional. Estos nodos que no llegan a ser divididos forman los nodos terminales del árbol.

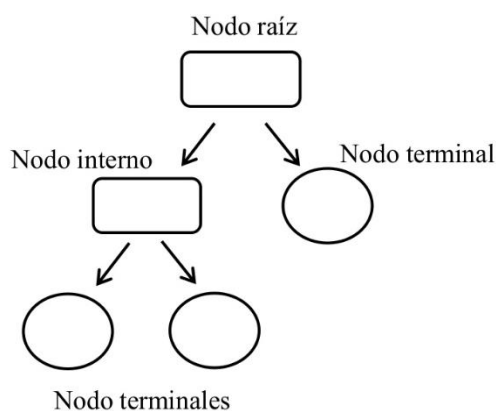


Figura 11. Estructura del árbol de clasificación. Se muestra la estructura de un árbol con tres niveles: el primer nivel con un único nodo, el nodo raíz; el segundo nivel con un nodo interno y un nodo terminal, y el tercer nivel con dos nodos terminales. Imagen de autoría propia.

Para conocer la aportación de cada anticuerpo en la clasificación de los pacientes con AR, se consideraron los niveles de cada anticuerpo como una escala ordinal (positivo-alto, por encima de la mediana de los positivos; positivo-bajo, por debajo de la mediana, y negativo) para construir el árbol. Se utilizó el índice de Gini como medida de pureza para conocer la variable que mejor separaba a los distintos nodos. La fracción de pacientes que se quedaron sin clasificar una vez construido el árbol, se fue modificando hasta que todos los anticuerpos (los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP) aparecieron representados al menos una vez. También se construyeron árboles para clasificar a los pacientes fumadores de los no fumadores en función de la presencia de autoanticuerpos. En este caso se utilizaron como variables clasificatorias la presencia o ausencia de cada anticuerpo, las combinaciones entre ellos y el número de autoanticuerpos presentes en el suero (es decir, la presencia /ausencia del FR, de los ACPA y de los anticuerpos anti-CarP, la combinación del FR y los ACPA, la combinación del FR y los anticuerpos anti-CarP, la combinación de los ACPA y los anticuerpos anti-CarP, la presencia de un solo anticuerpo, de dos anticuerpos y de tres). En este caso, también se utilizó el índice de Gini como medida de pureza. Estos árboles se construyeron utilizando el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

9.5 Evaluación de la calidad de los modelos.

Se utilizaron medidas que permiten conocer la calidad y bondad de un modelo estadístico, es decir, lo bien que se ajusta el modelo a los datos. Los estadísticos utilizados fueron el R^2 de Nagelkerke y el Criterio de Información de Akaike (AIC). El R^2 informa sobre la fracción de la varianza que es explicada por el modelo. Por lo tanto, el ajuste del modelo a los datos mejora al aumentar el valor de R^2 , ya que la variación explicada por el modelo es mayor. El AIC se utiliza siempre para comparar varios modelos y estima la cantidad de información que se pierde en el modelo. El modelo que presente un menor valor de AIC será el modelo de mayor calidad. Cuando se comparan dos modelos, se considera significativa una diferencia en el AIC >2 . Cuando las diferencias son >10 se interpreta que no hay ninguna duda para considerar como mejor modelo al de menor AIC²³⁸. El R^2 y el AIC se utilizaron en el estudio relacionado con la clasificación de la AR para estimar la calidad de los distintos modelos de clasificación diseñados.

9.6 Análisis multivariantes.

9.6.1 Regresión logística.

La asociación de los distintos anticuerpos con el desarrollo de la AR se analizó mediante un modelo de regresión logística multivariante. En el modelo se incluyeron como covariables el sexo, la edad de inicio de los síntomas y la cohorte. Para estudiar la asociación independiente de los anticuerpos anti-CarP respecto al resto de autoanticuerpos, los ACPA y el FR también se incluyeron como covariables en el modelo. En algunos modelos únicamente se consideró el estado (negativo o positivo) de cada uno de los distintos anticuerpos; y en otros, los anticuerpos se consideraron en función del nivel de sus títulos: positivo-alto, por encima de la mediana de los positivos; positivo-bajo, por debajo de la mediana; y negativo. En estos análisis, los ACPA y el FR se estudiaron como una única variable definida como “ACPA o FR”. En todos los análisis siempre se tomó como referencia la ausencia de anticuerpo o anticuerpos. El papel de la concordancia en la clasificación de la AR también se estimó utilizando este tipo de análisis. En este caso, en el modelo de regresión se incluyó como variable la presencia de uno, de dos o de tres autanticuerpos. En algunos modelos, la variable se definió combinando la concordancia con los criterios de clasificación

ACR/EULAR 2010. En todo caso, siempre se tomó como referencia la ausencia de anticuerpos (negatividad para los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP). En los análisis de la concordancia, los títulos de los ACPA y el FR se estratificaron de acuerdo a los criterios: positivo-alto, igual o superior a 3 veces el valor de la normalidad; positivo-bajo, inferior a ese valor; y negativo.

El modelo de regresión logística multivariante también se utilizó en el estudio de asociación entre los anticuerpos anti-CarP y la molécula HLA-DRB1. Este modelo se aplicó en el análisis de asociación entre estos anticuerpos y el alelo *DRB1*03*. Como covariables se incluyeron el sexo, la edad de inicio de los síntomas, el tiempo desde el inicio de la clínica, el EC y la interacción entre el EC y el alelo *DRB1*03*. El EC y el alelo *DRB1*03* se analizaron siguiendo un modelo de portadores, es decir, solo teniendo en cuenta la presencia del alelo, sin discriminar entre homocigotos y heterocigotos. Este análisis se realizó para conocer la asociación independiente de los anticuerpos anti-CarP con el alelo *DRB1*03* respecto al resto de variables de confusión.

Los análisis de regresión logística se realizaron utilizando el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Para todos ellos se representa el *P* valor, y la OR de la regresión con su intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %).

9.6.2 Regresión lineal.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida de la DMO se analizó mediante modelos de regresión lineal multivariante. En estos modelos se incluyeron como covariables el sexo, la edad de inicio de los síntomas, el IMC y la presencia de la menopausia. En algunos modelos, se incluyeron también la etnia y la actividad de la enfermedad. En las articulaciones MCF, la asociación se analizó utilizando los datos absolutos de la DMO en mg/cm^2 . En la CaT y la CoL, las asociaciones se estudiaron utilizando tanto los datos absolutos como las puntuaciones Z. Para analizar la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida de la DMO en estas tres localizaciones, se consideró tanto el estado de estos anticuerpos (positivo o negativo), como los títulos divididos en tres niveles: positivo alto, por encima de la mediana de los positivos; positivo-bajo, por debajo de la mediana; y negativo. Para conocer la asociación independiente de los anticuerpos anti-CarP con la disminución de la DMO, se

realizaron estos mismos análisis de regresión lineal en los pacientes ACPA negativos y ACPA positivos por separado, y considerando únicamente el título de los anticuerpos anti-CarP divididos en los tres niveles. Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa Stata 12.1 (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA), y tomando siempre como referencia la ausencia de anticuerpos. Para todos ellos se representa el *P* valor, el coeficiente de la regresión β y la desviación estándar (DS).

En el trabajo sobre la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad y el grado de incapacidad de los pacientes con EA también se utilizaron este tipo de modelos. La relación con la actividad se analizó utilizando los datos del DAS28 calculado con la VSG, al inicio del seguimiento y a los 6, 12 y 24 meses. La relación con la incapacidad funcional se analizó utilizando los datos basales y a los 6, 12 y 24 meses del HAQ. En todos los modelos se incluyeron el sexo, la edad y la cohorte como covariables. En algunos análisis se utilizaron otras variables de confusión a mayores, indicadas específicamente en el apartado de los resultados. Para conocer el efecto independiente de los anticuerpos anti-CarP, se realizaron análisis multivariantes incluyendo también a los ACPA y al FR. Además, se evaluaron las interacciones entre cada uno de los autoanticuerpos y las distintas variables de confusión consideradas. Por último, se tuvo en cuenta el efecto del tratamiento inicial de los pacientes sobre la actividad, incluyendo en el modelo el tratamiento con GC, con MTX u otros FAMEs, y el cambio del tratamiento durante el seguimiento. En algunos casos se utilizó la dosis de MTX definida como una variable cuantitativa, y en otros como una variable dicotómica (> 12.5 mg y < 12.5 mg). Todos los análisis se realizaron con el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), y tomando como referencia la ausencia de anticuerpos. Para todos ellos se representa el *P* valor, el coeficiente de la regresión β y la DS.

9.7 Combinación de cohortes: meta-análisis.

En el estudio acerca de la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la molécula HLA-DRB1 y en el estudio de la relación entre el tabaquismo y la presencia de autoanticuerpos, los datos de las distintas colecciones utilizadas se combinaron mediante meta-análisis²³⁹.

Existen dos métodos estadísticos para combinar y representar los resultados en un meta-análisis: el modelo de efectos fijos y el modelo de efectos aleatorios. El modelo de efectos

fijos asume que existe un único efecto común para toda la población de estudios. Por el contrario, el modelo de efectos aleatorios asume que cada estudio individual es la estimación de un efecto específico distinto, permitiendo que el efecto varíe entre los distintos estudios. Además, existen varios métodos estadísticos que permiten evaluar el grado de heterogeneidad, para valorar hasta qué punto los resultados que provienen de diferentes estudios pueden ser resumidos en una única medida.

Para evaluar la heterogeneidad, en este trabajo se utilizó el parámetro de inconsistencia (I^2), que indica la proporción de la variación entre estudios respecto a la variación total, es decir, la proporción de la variación total que es atribuible a la heterogeneidad. También, por defecto se utilizó el modelo de efectos fijos con el método de la varianza inversa, es decir, que los estudios con más muestras contribuyeron más que los estudios con menos muestras. El modelo de efectos aleatorios únicamente fue utilizado en los meta-análisis con una heterogeneidad notable ($I^2 > 60$). Los distintos meta-análisis se realizaron utilizando el paquete *meta*²⁴⁰ del programa estadístico R 3.2.3 (R Foundation, Vienna, Austria), y los resultados se representaron gráficamente utilizando un diagrama de bosque o *forest plot*.

En el estudio relacionado con el locus *HLA-DRB1*, los datos de las colecciones IDIPAZ, PEARL, IDIS, IdISSC, EIRA y EAC Leiden se combinaron mediante meta-análisis. Los pacientes de cada colección se estratificaron en base al estado de los anticuerpos anti-CarP y los ACPA: anti-CarP⁺ / ACPA⁻, anti-CarP⁻ / ACPA⁺, anti-CarP⁺ / ACPA⁺, anti-CarP⁻ / ACPA⁻. Las frecuencias de los distintos alelos se estudiaron en cada uno de los cuatro grupos; siguiendo siempre un modelo de portadores, sin discriminar entre heterocigotos y homocigotos. Las frecuencias de cada grupo se compararon con las frecuencias de los dobles negativos; es decir, que el grupo de ACPA⁻ / anti-CarP⁻ se utilizó en la mayoría de los análisis como referencia. En algún caso, se utilizó como referencia al grupo de sujetos control sin la enfermedad. De cualquier forma, la referencia utilizada aparece claramente indicada en el apartado de resultados.

En el estudio relacionado con el tabaquismo, los resultados de las colecciones IDIPAZ, PEARL, IDIS, IdISSC, IDIVAL, BARFOT, NOAR y EAC Leiden también se combinaron mediante meta-análisis. En este caso se estudió la relación del tabaquismo con la presencia de

cada anticuerpo, de sus combinaciones, o bien con el número de autoanticuerpos presentes en el suero. Para esto, los pacientes de cada colección se estratificaron en base a la presencia de un anticuerpo, de dos o dos tres; o bien según la presencia única de cada autoanticuerpo (ACPA⁺ / anti-CarP⁻ / FR⁻ , ACPA⁻/ anti-CarP⁺/ FR⁻ o ACPA⁻/anti-CarP⁻/FR⁺) o de sus combinaciones (ACPA⁺ / anti-CarP⁺ / FR⁻ , ACPA⁺/ anti-CarP⁻/ FR⁺, o ACPA⁻/anti-CarP⁺/FR⁺). En la mayoría de los análisis los triple negativos se utilizaron como referencia; aunque, de nuevo, en el apartado de resultados se indica claramente la referencia utilizada en cada uno de los casos. Además, en algunos análisis, las cohortes BARFOT, NOAR y EAC Leiden se juntaron en un mismo grupo (van Wesemael y col.), debido a la falta de información para alguno de los grupos analizados en cada una de las cohortes por separado.







RESULTADOS



RESULTADOS

CAPÍTULO 1.

Asociación de los anticuerpos anti-CarP con el alelo
*HLA-DRB1*03* en los pacientes con AR.

Specific association of HLA-DRB1*03 with anti-Carbamylated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis.

Cristina Regueiro, Luis Rodríguez-Rodríguez, Ana Triguero-Martínez, Laura Nuño, Angel L. Castaño-Nuñez, Alejandro Villalva, Eva Pérez-Pampín, Yolanda López-Golán, Lydia Abasolo, Ana M. Ortiz, Eva Herranz, Dora Pascual-Salcedo, Ana Martínez-Feito, María Dolores Boveda, Juan J. Gómez-Reino, Javier Martín, María Francisca González-Escribano, Benjamín Fernández-Gutiérrez, Alejandro Balsa, Isidoro González-Álvaro, Antonio González.

Regueiro C, Rodriguez-Rodriguez L, Triguero-Martinez A, et al Arthritis Rheumatol. 2019;71(3):331–339. doi:10.1002/art.40738. Anexo 1.



1.1. Prevalencia de autoanticuerpos en los pacientes con AR incluidos.

La relación de los anticuerpos anti-CarP con los alelos de HLA-DRB1 se analizó en los pacientes con AR procedentes de la cohorte IDIPAZ (n = 242), de la cohorte PEARL (n = 256) y de la cohorte IdISSC (n = 628). En total, 1126 pacientes que se analizaron junto con los datos previamente publicados de nuestro centro, IDIS (n = 520)²⁶, y de las colecciones EIRA (n = 1348)⁷³ y EAC Leiden (n = 715)⁷³.

En la Tabla 8 se recoge la distribución de los autoanticuerpos analizados: los anticuerpos anti-CarP, los ACPA, y sus combinaciones. La frecuencia de los ACPA fue bastante uniforme en las cohortes IDIPAZ, PEARL, IDIS e EIRA, con un porcentaje de positivos en torno al 60-70 %. En las cohortes IdISSC y EAC Leiden, la presencia de los ACPA fue menor, con una positividad del 50 % aproximadamente. El 30-40 % de los pacientes fueron positivos para los anticuerpos anti-CarP. La cohorte IDIS presentó el porcentaje más bajo para estos anticuerpos (29.4 %), mientras que en las cohortes IDIPAZ y EAC Leiden los anticuerpos anti-CarP representaron el 45.9 y 46.9 %, respectivamente. Como resultado de la concordancia entre los dos autoanticuerpos, la mayor parte de los pacientes anti-CarP positivos también fueron positivos para los ACPA (Tabla 8). En consecuencia, los pacientes únicamente positivos para uno de los dos anticuerpos formaron los grupos más pequeños, especialmente los anti-CarP⁺/ACPA⁻, que únicamente representaron el 4.5-7.3 % del total (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia de los autoanticuerpos en los pacientes con AR utilizados. En la tabla se muestra el número y porcentaje de los anticuerpos anti-CarP, los ACPA y sus combinaciones en los pacientes con AR de las 6 colecciones.

ANTICUERPO	IDIPAZ	PEARL	IdISSC	IDIS	EIRA	EAC Leiden
anti-CarP ⁺	111 (45.9)	95 (37.5)	192 (30.6)	153 (29.4)	458 (34.0)	335 (46.9)
ACPA ⁺	170 (70.2)	157 (62.1)	308 (49.0)	334 (64.2)	820 (60.8)	381 (53.3)
anti-CarP ⁻ /ACPA ⁻	61 (25.2)	78 (30.8)	288 (45.9)	206 (39.6)	469 (34.8)	282 (39.4)
anti-CarP ⁺ /ACPA ⁻	11 (4.5)	18 (7.1)	32 (5.1)	25 (4.8)	59 (4.4)	52 (7.3)
anti-CarP ⁻ /ACPA ⁺	70 (28.9)	80 (31.6)	148 (23.6)	161 (40.0)	421 (31.2)	98 (13.7)
anti-CarP ⁺ /ACPA ⁺	100 (41.3)	77 (30.4)	160 (25.5)	128 (24.6)	399 (29.6)	283 (39.6)

1.2. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con los alelos de *HLA-DRB1*.

El complejo HLA confiere el mayor riesgo genético en la AR. Dentro de este complejo, la mayor parte de la contribución genética a la AR reside en la molécula HLA-DRB1. Por este motivo se analizó la asociación entre los anticuerpos anti-CarP y los alelos del HLA-DRB1 combinando los datos de las 6 colecciones mediante meta-análisis. Los pacientes de cada colección se estratificaron en cuatro grupos definidos por la presencia de los anticuerpos anti-CarP y los ACPA (anti-CarP⁺/ACPA⁻, anti-CarP⁻/ACPA⁺ y anti-CarP⁺/ACPA⁺) y las frecuencias de los distintos alelos en cada uno de los grupos se compararon con las frecuencias en los doble negativos (anti-CarP⁻/ACPA⁻). El grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ fue especialmente interesante, por ser el grupo donde se pueden identificar las asociaciones específicas de los anticuerpos anti-CarP sin la interferencia de los ACPA.

Los primeros alelos analizados fueron los incluidos dentro del EC (Figura 12). El resultado en el grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ (Figura 12.A, $p = 0.3$ $I^2 = 0\%$) permitió confirmar la falta de asociación de los anticuerpos anti-CarP con estos alelos, que es algo publicado previamente por otros autores^{26,39,73} y comentado en el apartado de la introducción. Por otro lado, el resultado significativo en los grupos anti-CarP⁻/ACPA⁺ (Figura 12.B, $p < 10^{-16}$ $I^2 = 43\%$) y anti-CarP⁺/ACPA⁺ (Figura 12.C, $p < 10^{-16}$ $I^2 = 72\%$; dada la elevada heterogeneidad: OR = 3.6 y $p = 4.7 \times 10^{-13}$ del meta-análisis de efectos aleatorios) reafirmó la fuerte asociación entre el EC y los ACPA. Con el fin de conocer si alguno de estos dos grupos mostraba una asociación dominante con los alelos del EC, los pacientes anti-CarP⁻/ACPA⁺ y anti-CarP⁺/ACPA⁺ se compararon directamente mediante meta-análisis. Los resultados no mostraron diferencias significativas (OR = 1.19, $p = 0.1$, $I^2 = 40.4\%$), lo que implica que el efecto del EC no es mayor en ninguno de los grupos. Es decir, el valor de la OR en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁺ es nominalmente mayor, pero el efecto del EC en este grupo no domina frente al efecto de estos alelos en los pacientes anti-CarP⁻/ACPA⁺.

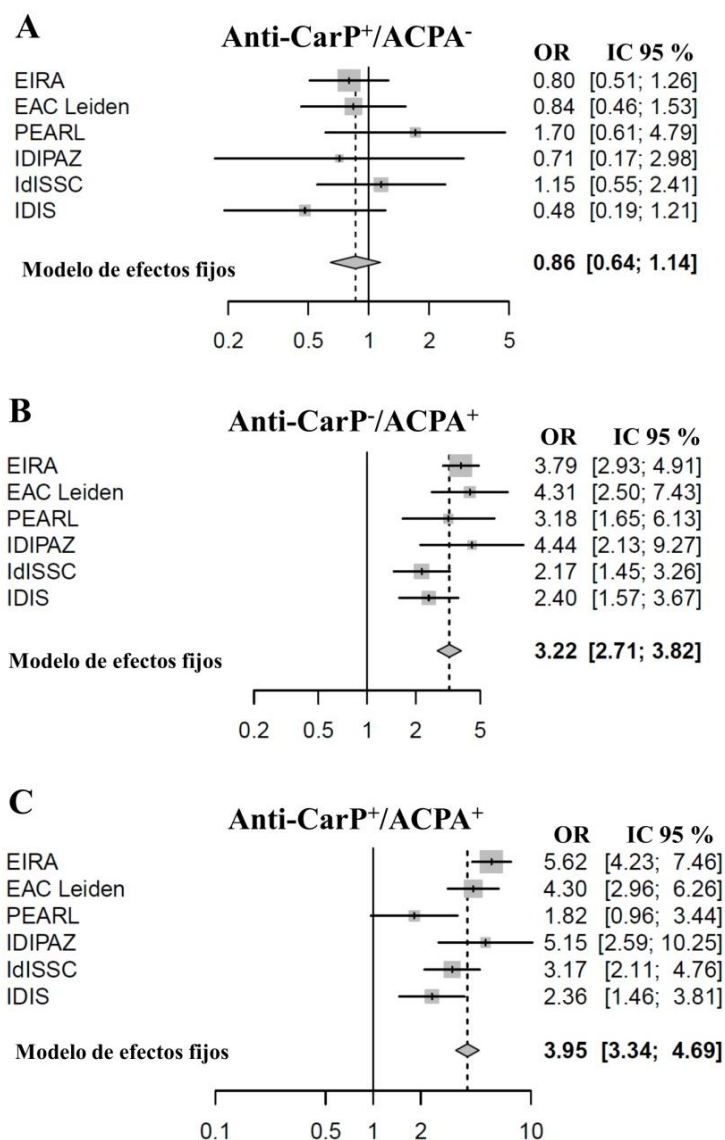


Figura 12. Asociación del EC con los pacientes con AR estratificados por la presencia de anticuerpos anti-CarP y ACPA. En la figura se muestra la asociación del EC con los pacientes A. anti-CarP⁺/ACPA⁻, B. anti-CarP⁻/ACPA⁺ y C. anti-CarP⁺/ACPA⁺, tomando como referencia a los dobles negativos. En los tres casos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efecto fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.

También se analizaron por separado los alelos más comunes del EC: los alelos del grupo *DRB1*01*, del *DRB1*04* y del *DRB1*10*. Los resultados fueron similares para los alelos de los grupos **04* y **10*: falta de asociación con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ y asociación significativa con los pacientes positivos para los ACPA. Los alelos del grupo **01* mostraron una asociación mucho más débil y únicamente con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁺ (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de los distintos alelos *DRB1 en los pacientes con AR estratificados por la presencia de anti-CarP y ACPA.** En la tabla se muestra la OR, el p valor, y la I^2 resultantes del meta-análisis realizado para cada alelo en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻, anti-CarP⁻/ACPA⁺ y anti-CarP⁺/ACPA⁺.

<i>DRB1</i> *	Anti-CarP ⁺ /ACPA ⁻			Anti-CarP ⁻ /ACPA ⁺			Anti-CarP ⁺ /ACPA ⁺		
	OR	p	I^2	OR	p	I^2	OR	p	I^2
*01	0.65	0.03	0	1.12	0.3	41	1.26	0.01	55
*04	1.31	0.12	26	3.84 ¹	2.8 x10 ⁻¹⁰	77	3.85	<10 ⁻¹⁶	0
*10	1.18 ²	0.7	0	2.23	0.0009	38	2.56	6.6 x10 ⁻⁵	35
*03	1.57	0.006	0	0.50	1.0 x10 ⁻⁷	0	0.46	1.1 x10 ⁻¹⁴	53
*07	0.94	0.8	51	0.65	0.0003	45	0.75	0.008	0
*08	1.31 ²	0.3	0	0.53	0.0005	0	0.4	6.4 x10 ⁻⁷	34
*09	0.87 ³	0.8	0	1.86 ²	0.015	51	1.60 ²	0.058	44
*11	1.20	0.3	0	0.66	0.0005	49	0.5	1.8 x10 ⁻⁸	23
*13	0.92	0.6	0	0.49	1.8 x10 ⁻¹⁰	17	0.35 ¹	6.9 x10 ⁻⁵	77
*14	1.54 ²	0.15	0	0.73	0.15	7	0.79	0.3	47
*15	0.79	0.3	0	1.01	0.9	7	0.93	0.5	0
*16	1.12 ³	0.8	0	1.66	0.07	0	1.30	0.4	43

¹La OR y el p valor se corresponden con el meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efectos aleatorios.

²Los datos de las cohortes PEARL e IDIPAZ se combinaron debido a la falta de pacientes en alguno de los grupos incluidos en el análisis. ³Además de los datos de las cohortes PEARL e IDIPAZ, los datos de las cohortes IDIS e IDISSC se consideraron como un único estudio debido a la falta de pacientes en alguno de los grupos analizados.

Una vez examinados los alelos del EC, se pasó a analizar el resto de alelos del HLA-DRB1 (Tabla 9). Los alelos *08, *11, *13 y *03 mostraron un efecto protector significativo en los grupos de pacientes ACPA positivos. Este resultado no es sorprendente, ya que la protección de estos alelos frente a la AR seropositiva ya ha sido observada previamente por otros autores⁹⁰. El alelo *09 también mostró una asociación con el grupo de pacientes anti-CarP⁻/ACPA⁺. Sin embargo, esta asociación es cuestionable debido a la baja frecuencia del alelo *09 en las muestras utilizadas. En el grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ el único alelo que mostró una asociación significativa fue el 03* (Figura 13. A, Tabla 9). A pesar de esta asociación, el efecto protector del *03 en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁺ no fue diferente del efecto en el grupo anti-CarP⁻/ACPA⁺ (OR = 0.85, IC 95 %: 0.66-1.08, p = 0.2, I^2 = 0). La asociación del *03 con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ fue consistente a lo largo de las 6

coleccionas estudiadas (Figura 13.A). Esta consistencia, además de dar solidez al resultado, explica el motivo por el cual se decidió realizar un análisis más detallado sobre la asociación del alelo *03 en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻.

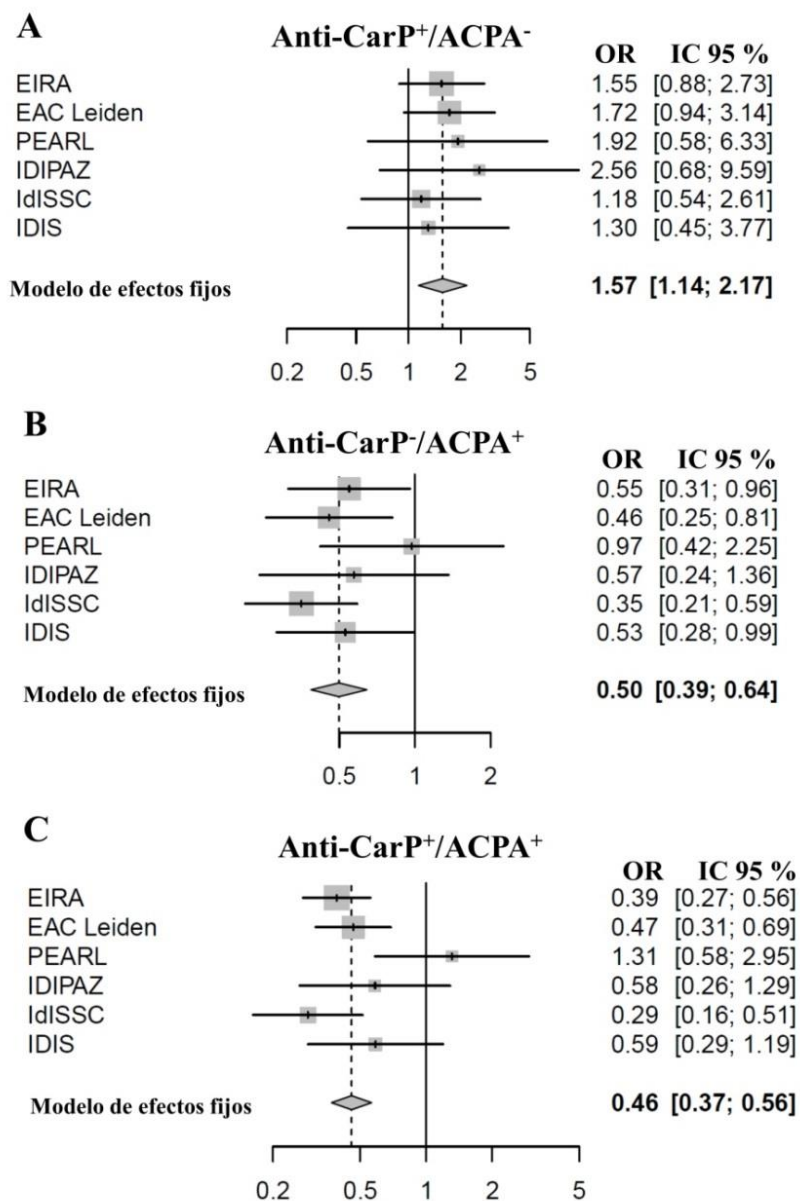
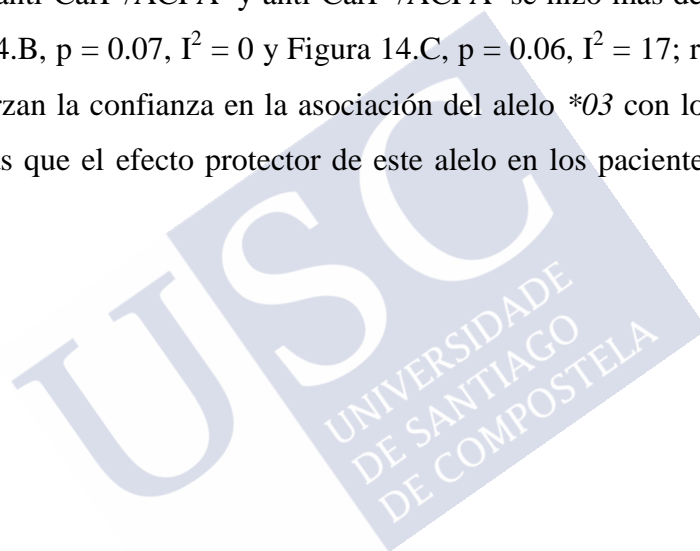


Figura 13. Asociación del alelo DRB1*03 con los tres grupos de pacientes definidos por la presencia de anti-CarP y ACPA. En la figura se muestra la asociación del alelo *03 con los pacientes A. anti-CarP⁺/ACPA⁻, B. anti-CarP⁻/ACPA⁺ y C. anti-CarP⁺/ACPA⁺, tomando como referencia a los dobles negativos. En los tres casos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efecto fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.

1.3. Análisis detallado de la relación entre los anticuerpos anti-CarP y el alelo *HLA-DRB1*03*.

La relación entre el alelo **03* y el grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ se analizó más al detalle considerando toda una serie de casuísticas que pueden afectar a los resultados encontrados. La asociación tan fuerte del EC con la AR introduce un sesgo que podría artefactuar la asociación del alelo **03* con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻. Para descartar este efecto del EC, se repitió el análisis en el subgrupo de pacientes no portadores de estos alelos (Figura 14). La asociación del alelo *DRB1*03* en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ siguió siendo significativa (Figura 14.A, $p = 0.04$, $I^2 = 0$). Sin embargo, el papel protector de este alelo en los pacientes anti-CarP⁻/ACPA⁺ y anti-CarP⁺/ACPA⁺ se hizo más débil y dejó de ser significativo (Figura 14.B, $p = 0.07$, $I^2 = 0$ y Figura 14.C, $p = 0.06$, $I^2 = 17$; respectivamente). Estos resultados refuerzan la confianza en la asociación del alelo **03* con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻, mientras que el efecto protector de este alelo en los pacientes ACPA⁺ pasa a ser más cuestionable.



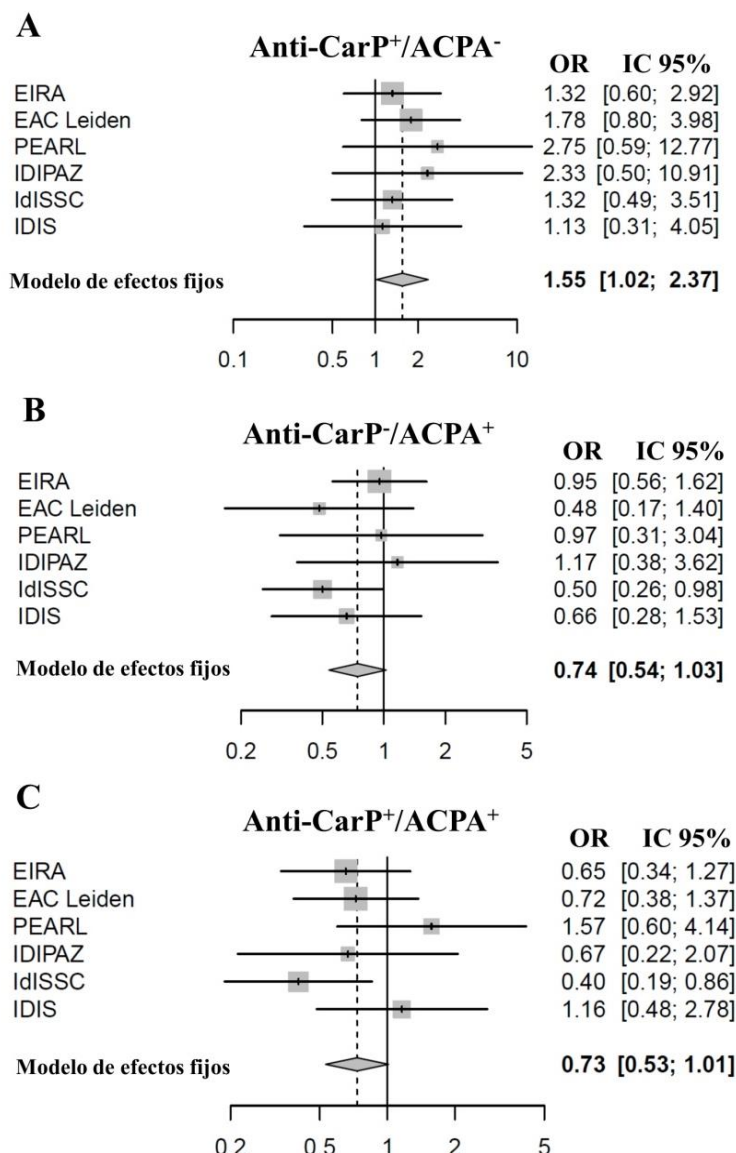


Figura 14. Asociación del alelo *DRBI*03* con los pacientes EC negativos. En la figura se muestra la asociación del alelo **03* con los pacientes EC negativos A. anti-CarP⁺/ACPA⁻, B. anti-CarP⁻/ACPA⁺ y C. anti-CarP⁺/ACPA⁺, tomando como referencia a los dobles negativos. En los tres casos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efectos fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.

Todas las variables que pudiesen tener una influencia en la asociación del alelo **03* con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ se utilizaron para realizar un análisis multivariante. Además de la presencia del EC, se tuvo en cuenta el sexo, la edad, el tiempo desde el inicio de la enfermedad, y la interacción entre el EC y el alelo **03*. Estas variables se utilizaron para ajustar el análisis multivariante y así eliminar el efecto de todas ellas sobre la asociación

encontrada. Las variables mencionadas únicamente estuvieron disponibles para las cohortes IDIPAZ, PEARL, IdISSC e IDIS (Tabla 10). Como consecuencia de esta disminución del tamaño muestral, el poder estadístico se redujo. Por este motivo los resultados de este análisis se centraron únicamente en los valores de la OR, que no se ven afectados por el tamaño de la muestra. Tras ajustar con las 5 variables de confusión, el valor de la OR continuó siendo muy parecido (1.53 en el análisis multivariante vs 1.57 en el meta-análisis). Este resultado demuestra la falta de influencia de las variables consideradas y fortalece la asociación del alelo *03 con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻.

Tabla 10. Características de los pacientes con AR utilizados en el análisis multivariante.

CARACTERÍSTICAS	IDIPAZ (n = 242)	PEARL (n = 256)	IDIS (n = 520)	IdISSC (n = 628)
Mujeres (%)	184 (76.0)	211 (82.4)	399 (76.7)	460 (73.2)
Edad inicio de los síntomas, mediana (IQR)	53 (42-67)	56 (45-68)	49 (36-57)	56 (45-65)
Meses de evolución, mediana (IQR)	4 (2-6)	6 (4-9)	144 (60-252)	48 (24-96)
<i>DRBI*EC</i> (%)	146 (60.3)	144 (56.3)	299 (57.5)	327 (52.1)
<i>DRBI*03</i> (%)	47 (19.4)	48 (18.8)	63 (12.1)	128 (20.4)

La referencia utilizada también podría estar afectando a los resultados obtenidos. Por este motivo, el grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ se sustituyó por controles sanos. De nuevo, esto llevó a una reducción del tamaño muestral, ya que no se disponía de un grupo control para cada una de las seis colecciones. En el análisis solo se incluyeron las colecciones de EIRA, Leiden EAC e IDIS, lo que implicó un total de 2583 pacientes con AR y 2305 controles sanos. La frecuencia del alelo *03 se encontró incrementada tanto en el grupo de pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ (Figura 15.B, $p = 3.4 \times 10^{-5}$, $I^2 = 0$) como en los anti-CarP⁻/ACPA⁻ (Figura 15.A, $p = 0.0006$, $I^2 = 8$). Sin embargo, al comparar directamente ambos grupos, el efecto del alelo *03 fue significativamente mayor en los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻ (OR = 1.55, IC 95 %: 1.02-2.37, $p = 0.04$, $I^2 = 0$). Este último resultado es especialmente relevante, ya que confirma la especificidad de la asociación del *03 con los pacientes exclusivamente positivos para los anticuerpos anti-CarP. Como cabría esperar, utilizando a controles como referencia, la frecuencia del alelo *03 se encontró disminuida en

los grupos de pacientes anti-CarP⁻/ACPA⁺ (Figura 15.C, $p = 0.002$, $I^2 = 0$) y anti-CarP⁺/ACPA⁺ (Figura 15. D, $p = 9.6 \times 10^{-6}$, $I^2 = 41$), sin diferencias significativas entre ellos (OR = 1.58, IC 95 %: 1.08-2.32, $p = 0.02$, $I^2 = 0$).

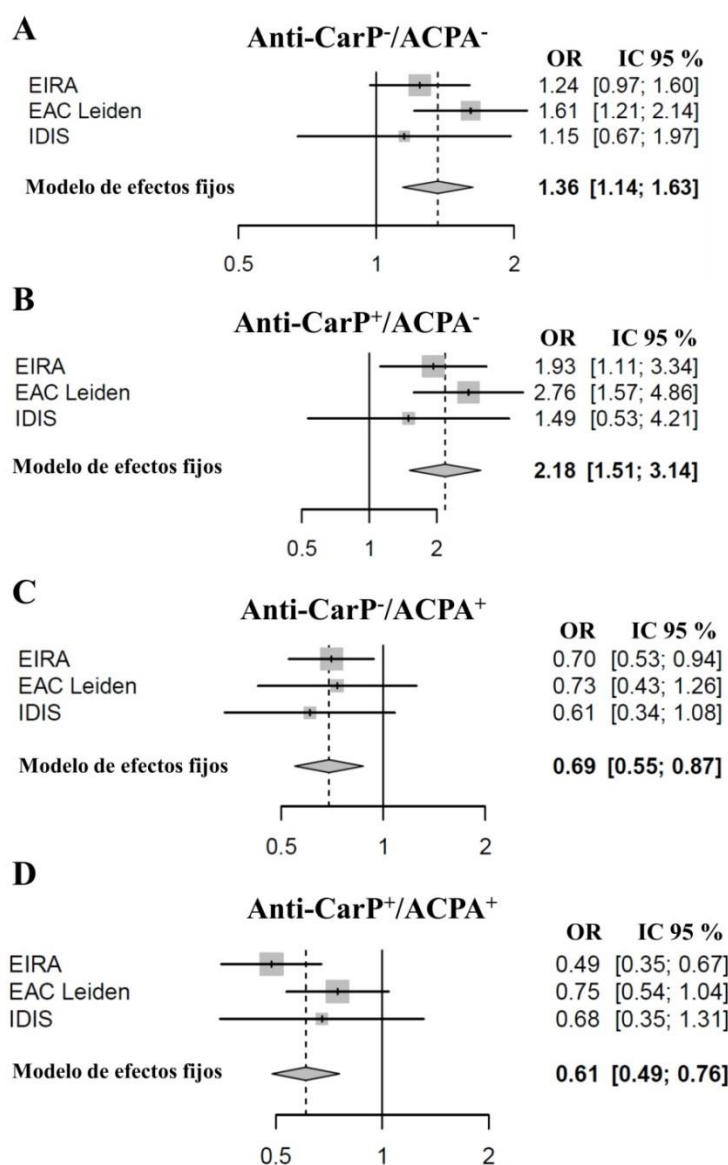


Figura 15. Asociación del alelo DRB1*03 con los cuatro grupos de pacientes estratificados por la presencia de anti-CarP y ACPA utilizando como referencia a los controles. En la figura se muestra la asociación del alelo *03 con los pacientes A. anti-CarP⁻/ACPA⁻, B. anti-CarP⁺/ACPA⁻, C. anti-CarP⁻/ACPA⁺ y D. anti-CarP⁺/ACPA⁺, tomando como referencia a los controles sanos. En los tres casos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efecto fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.



CAPÍTULO 2.

Relación del tabaquismo con la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes con AR.

A predominant association of the triple seropositive patients and others with rheumatoid factor in the association of smoking with rheumatoid arthritis.

Cristina Regueiro, Luis Rodríguez-Rodríguez, Raquel López-Mejías, Laura Nuño, Ana Triguero-Martínez, Eva Pérez-Pampín, Alfonso Corrales, Alejandro Villalva, Yolanda López-Golán, Lydia Abasolo, Sara Remuzgo-Martínez, Ana M. Ortiz MD, Eva Herranz, Ana Martínez-Feito, Carmen Conde, Antonio Mera, Alejandro Balsa, Isidoro González-Álvaro, Miguel Ángel González-Gay, Benjamín Fernández-Gutierrez, Antonio González.

Regueiro C, Rodriguez-Rodriguez L, Raquel Lopez-Mejias et al. Sci Rep. Aceptado.



2.1. Replicación de la asociación del tabaquismo con la presencia concordante de tres autoanticuerpos.

La asociación del tabaco con la AR seropositiva se ha explicado como consecuencia de la citrulinación de proteínas inducida por el tabaco a nivel pulmonar. Estas proteínas citrulinadas serían las encargadas de iniciar reacciones inmunes favoreciendo la producción de los ACPA. Sin embargo, como se ha comentado en el apartado de introducción, no todos los hallazgos han ido acordes con este modelo patogénico y cada vez hay más trabajos en los que la asociación del tabaco no se vincula exclusivamente a los ACPA. El estudio de *van Wesemael y col.* es uno de estos ejemplos⁵⁵. Sus resultados muestran que el tabaco, en lugar de asociarse específicamente con los ACPA, se asocia con la presencia simultánea de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP. Para tratar de comprender un poco mejor el papel del tabaco en la producción de anticuerpos en la AR, en esta parte del proyecto se exploró la relación entre el tabaquismo y la presencia concordante de los tres autoanticuerpos.

Los resultados de *van Wesemael y col.* se intentaron replicar utilizando 2253 pacientes con AR procedentes de las cohortes IDIPAZ, PEARL, IdISSC, IDIS, IDIVAL y Rome. Se consideraron fumadores tanto los pacientes que fumaban en el momento de recogida de la muestra como aquellos que habían fumado en el pasado. En conjunto, los fumadores representaron alrededor de la mitad de los pacientes (43.6 - 55.1 %); excepto en la cohorte IDIS, donde el porcentaje de fumadores fue mucho más bajo (Tabla 11). Como valor medio, el porcentaje de pacientes FR positivos fue del 61.7 %, el de los ACPA positivos del 57.7 % y el de los anti-CarP positivos del 34.4 %, aunque con variaciones entre las distintas cohortes (Tabla 11). Los pacientes se estratificaron en función del número de autoanticuerpos presentes en el suero: 0 anticuerpos, 1 anticuerpo, 2 anticuerpos y 3 anticuerpos. Los pacientes con un único anticuerpo fueron los menos frecuentes, y los positivos para 2 o 3 autoanticuerpos presentaron un porcentaje bastante similar, en torno al 30 % (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de fumadores y prevalencia de autoanticuerpos en las colecciones de pacientes con AR estudiadas. En la tabla se incluyen las cohortes utilizadas en la fase de replicación y las del estudio de van Wesemael y col., incluidas en la fase de descubrimiento. Los valores se corresponden con el número y porcentaje de fumadores y de los distintos anticuerpos.

	REPLICACIÓN						DESCUBRIMIENTO		
	IDIPAZ	PEARL	IDIS	IdISSC	IDIVAL	Rome	NOAR	EAC Leiden	BARFOT
n	243	264	470	508	459	309	678	769	795
Fumadores	48.1	43.6	20.4	45.7	55.1	54	63.7	54	59.2
FR ⁺	69.1	66.3	59.8	64.8	51.2	65.4	40.9	57.5	56.4
ACPA ⁺	70	61.7	63.8	49.4	49	61.5	36.4	52.5	57.4
Anti-CarP ⁺	44.9	37.9	30	31.1	32.5	37.9	26.8	45.4	35.1
Nº anticuerpos									
0	22.2	22.3	23.6	27.8	37.7	20.1	43.1	34.5	33.1
1	8.6	17	20.2	23.2	17	21.7	24.6	16.8	13.8
2	32.1	33	35.1	25	20.3	31.7	15.9	16.6	24.3
3	37	27.7	21.1	24	25.1	26.5	15.8	35.1	28.8

Esta estratificación de los pacientes se utilizó para analizar la relación del tabaquismo con el número de anticuerpos (Tabla 12). Los pacientes positivos para tres autoanticuerpos fueron los únicos que mostraron una asociación significativa con el hábito tabáquico (OR = 1.99, IC 95 %: 1.56-2.54, $p = 2.5 \times 10^{-8}$, $I^2 = 26$). Esta asociación no solo fue significativa en relación a los pacientes sin anticuerpos, sino que también lo fue frente a los pacientes con un anticuerpo (OR = 1.68, IC 95 %: 1.32-2.13, $p = 2.2 \times 10^{-5}$, $I^2 = 0$) y con dos anticuerpos (OR = 1.61, IC 95 %: 1.27-2.04, $p = 8.1 \times 10^{-5}$, $I^2 = 0$). Por el contrario, los pacientes fumadores positivos para uno o dos autoanticuerpos no fueron diferentes de los pacientes negativos para los tres autoanticuerpos. Estos resultados concuerdan con los de *van Wesemael y col.*, y refuerzan la asociación del tabaquismo con la presencia simultánea de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP.

RESULTADOS

Tabla 12. Asociación del tabaquismo con el número de autoanticuerpos en los pacientes con AR utilizados en la replicación. En la tabla se muestra el número de pacientes fumadores y no fumadores con 0, 1, 2 o 3 autoanticuerpos en cada una de las cohortes de replicación. Se indican los resultados del meta-análisis realizado con el modelo de efectos fijos (OR^1) y con el modelo de efectos aleatorios (OR^2), debido a la heterogeneidad significativa de las colecciones en alguno de los análisis.

COHORTE		NÚMERO DE ANTICUERPOS			
		0	1	2	3
IDIPAZ	No Fumador	40	7	38	41
	Fumador	14	14	40	49
PEARL	No Fumador	37	28	51	33
	Fumador	22	17	36	40
IdISSC	No Fumador	90	60	75	51
	Fumador	51	58	52	71
IDIS	No Fumador	83	81	138	72
	Fumador	28	14	27	27
IDIVAL	No Fumador	88	39	41	38
	Fumador	85	39	52	77
Rome	No Fumador	31	34	45	32
	Fumador	31	33	53	50
META-ANÁLISIS					
	OR¹	1.0 (Ref.)	1.19	1.19	1.99
	IC 95 %¹	-	0.91-1.55	0.94-1.52	1.56-2.54
	P¹	-	0.2	0.2	2.5 x 10 ⁻⁸
	OR²	1.0 (Ref.)	1.22	1.22	1.99
	IC 95 %²	-	0.74-2.01	0.84-1.77	1.49-2.64
	P²	-	0.4	0.3	2.5 x 10 ⁻⁶

2.2. Asociación entre el tabaquismo y la presencia concordante de autoanticuerpos combinando todos los datos disponibles.

Las seis colecciones utilizadas en la fase de replicación se combinaron con las tres colecciones del estudio de *van Wesemael y col.*, juntando un total de 4494 pacientes con AR. Este incremento del tamaño muestral permitió obtener la potencia estadística necesaria para analizar los distintos subgrupos de pacientes y confirmar los resultados anteriores.

De nuevo, se observó una asociación predominante entre el tabaquismo y los pacientes positivos para los tres autoanticuerpos, tanto en relación a los pacientes negativos (Figura 16. A, $p = 4.4 \times 10^{-16}$, $I^2 = 17$) como a los positivos para uno (OR = 1.77, IC 95 %:1.46-2.14, $p = 7.5 \times 10^{-9}$, $I^2 = 34$) o dos anticuerpos (OR = 1.54, IC 95 %:1.29-1.84, $p = 1.4 \times 10^{-6}$, $I^2 = 12$). Con la combinación de todas las colecciones también se encontró un incremento significativo del porcentaje de fumadores en los dobles positivos (Figura 19. B, $p = 0.009$, $I^2 = 41$). Por el contrario, los pacientes positivos para un único anticuerpo no mostraron ninguna asociación con el hábito tabáquico (Figura 16. C, $p = 0.4$, $I^2 = 56$, siguiendo el modelo de efectos aleatorios por la elevada heterogeneidad).

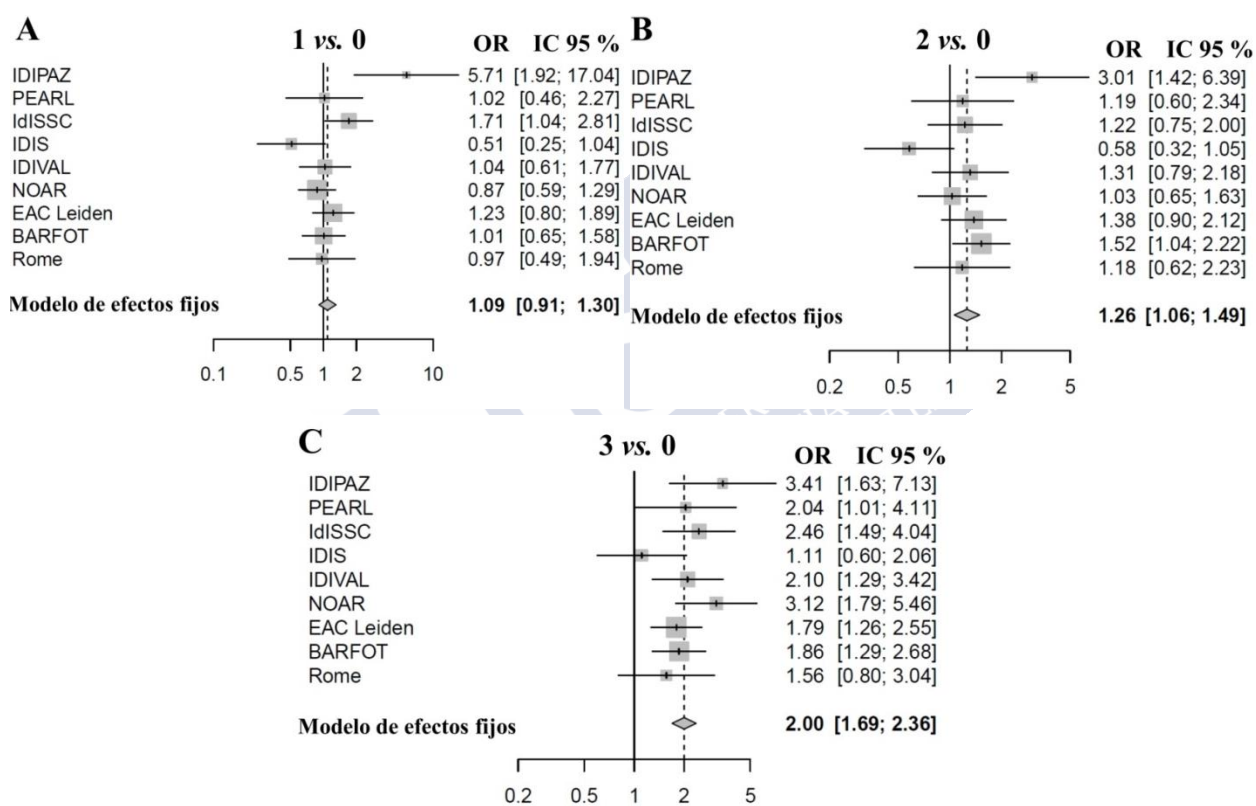


Figura 16. Asociación del tabaquismo con el número de autoanticuerpos en el meta-análisis incluyendo las cohortes de replicación y descubrimiento. En la figura se muestra la asociación del tabaco en los pacientes A. positivos para un anticuerpo, B. dobles y C. triples positivos, tomando como referencia a los pacientes negativos para los tres anticuerpos. En los tres casos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efecto fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.

2.3. Asociación del tabaquismo con la presencia del FR en los pacientes con uno o dos autoanticuerpos.

Una vez analizada la relación entre el tabaco y el número de autoanticuerpos, se intentó buscar alguna asociación específica entre el tabaquismo y alguno de los tres anticuerpos estudiados. Para esto se analizaron por separado los pacientes únicamente positivos para el FR, para los ACPA o para los anticuerpos anti-CarP. Los pacientes solo positivos para el FR (FR^+_{1}) fueron los únicos que mostraron una asociación significativa con el tabaco, mientras que los positivos para los ACPA o los anticuerpos anti-CarP apenas fueron distintos de los pacientes triple negativos (Tabla 13).

La asociación del tabaco con los pacientes doble positivos únicamente fue significativa en presencia del FR (FR^+_{2}) (OR = 1.30, IC 95 %: 1.09-1.55, $p = 0.004$, $I^2 = 40$). Por el contrario, los pacientes $ACPA^+/\text{anti-CarP}^+/\text{FR}^-$ (FR^-_{2}) no se diferenciaron de los triple negativos (OR = 0.95, IC 95 %: 0.64-1.39, $p = 0.8$, $I^2 = 32$). La asociación del tabaquismo con los pacientes FR^+ no fue diferente al comparar aquellos con uno (FR^+_{1}) o dos anticuerpos (FR^+_{2}) ($p = 0.9$). Por este motivo, ambos grupos se juntaron en uno solo (FR^+_{1+2}). Como cabría esperar, este grupo de pacientes FR^+ (FR^+_{1+2}) mostró una asociación significativa con el hábito tabáquico (Figura 27.A, $p = 0.001$, $I^2 = 45\%$), con un efecto más fuerte al utilizar a todos los pacientes FR negativos como referencia (Figura 27.B, $p = 0.0002$, $I^2 = 0$).

Tabla 13. Asociación del tabaco con la presencia de los autoanticuerpos estudiados en los pacientes con AR que solo tienen un anticuerpo. En la tabla se muestra el número fumadores y no fumadores en el grupo de pacientes únicamente positivos para el FR (FR⁺/ ACPA⁻/anti-CarP⁻), para los ACPA (FR⁻/ ACPA⁺/anti-CarP⁻) o para los anticuerpos anti-CarP (FR⁻/ ACPA⁻/anti-CarP⁺). Se indican los resultados del meta-análisis realizado con el modelo de efectos fijos (OR¹) y con el modelo de efectos aleatorios (OR²), debido a la heterogeneidad significativa detectada en alguno de los análisis.

COHORTE		ANTICUERPO			
		0	FR ⁺ ₁	ACPA ⁺ ₁	Anti-CarP ⁺ ₁
IDIPAZ	No Fumador	40	2	4	1
	Fumador	14	6	6	2
PEARL	No Fumador	37	13	9	6
	Fumador	22	10	4	3
IdISSC	No Fumador	90	45	8	7
	Fumador	51	42	10	6
IDIS	No Fumador	83	28	43	10
	Fumador	28	8	4	2
IDIVAL	No Fumador	88	18	11	10
	Fumador	85	21	12	6
van Wesemael y col.	No Fumador	367	84	57	43
	Fumador	430	122	59	41
Rome	No Fumador	31	14	6	14
	Fumador	31	12	9	12
Meta-análisis					
	OR ¹	1.0 (Ref.)	1.28	1.0	0.86
	IC 95 % ¹	-	1.03-1.61	0.74-1.34	0.61-1.21
	P ¹	-	0.03	0.10	0.39
	I ² , %	-	16.5	53.4	0
	OR ²	1.0 (Ref.)	1.29	1.10	0.86
	IC 95 % ²	-	0.98-1.70	0.65-1.85	0.61-1.21
	P ²	-	0.07	0.724	0.39

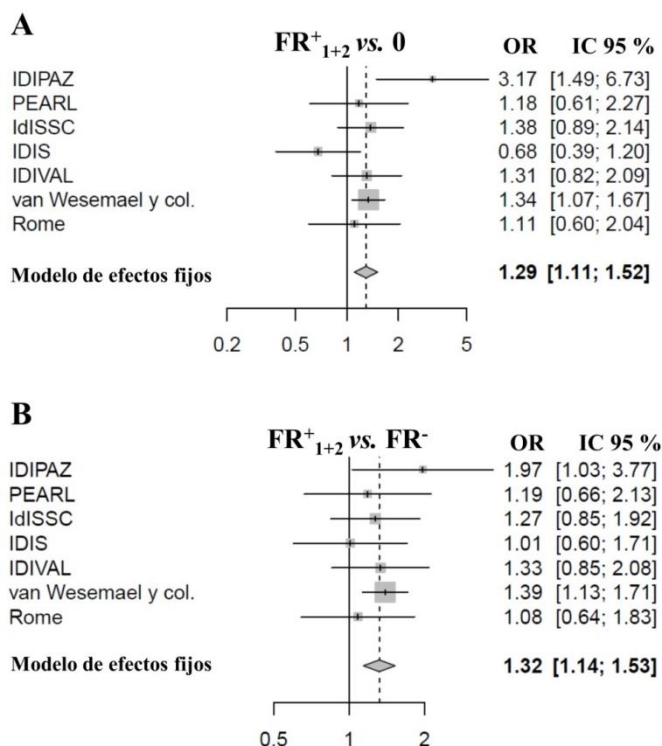


Figura 17. Asociación del tabaco con la presencia del FR en los pacientes con AR que presentan uno o dos autoanticuerpos. En la figura se muestra la asociación del tabaquismo con los pacientes FR⁺ con uno y dos anticuerpos (FR⁺₁₊₂) utilizando en A. los triples negativos (0) como referencia y en B. todos los pacientes FR⁻. En los dos gráficos se muestra el resultado del meta-análisis realizado siguiendo el modelo de efectos fijos. En cada *forest plot* se representa el valor de la OR y el IC 95 % de cada una de las colecciones. El peso relativo de cada cohorte está representando por el tamaño de los cuadrados, y la OR con el IC 95 % resultante del meta-análisis aparece indicada con un diamante.

2.4. Análisis exploratorio en todos los pacientes.

En todos los análisis anteriores los pacientes de cada colección se estratificaron por la presencia de los anticuerpos anti-CarP, los ACPA y el FR. Con el fin de evitar esta división de la muestra, se decidió realizar un análisis exploratorio que permitiese incluir a todos los pacientes sin estratificar por su estatus de seropositividad o por colección. Los árboles de clasificación se seleccionaron como método de análisis, ya que identifican la mejor forma de diferenciar a los pacientes fumadores de los no fumadores a partir del estado de cada uno de los autoanticuerpos y sus combinaciones (Figura 18).

La primera división del árbol se realizó de acuerdo a la presencia concordante de los tres autoanticuerpos. Así, la triple seropositividad quedaría definida como la mejor herramienta para diferenciar a los pacientes fumadores de los no fumadores. El FR fue el siguiente en

aparecer, clasificando a los pacientes restantes que no fueron positivos para los tres autoanticuerpos. La última división del árbol fue más compleja, y dividió a los pacientes FR positivos en dos grupos. Por un lado, el grupo de pacientes con más fumadores definido por la presencia única de este anticuerpo, y por otro lado, el grupo con menos fumadores definido por la presencia concurrente del FR y otro autoanticuerpo (los ACPA o los anticuerpos anti-CarP). En todo caso, las dos primeras divisiones del árbol replicaron los resultados obtenidos en los análisis estratificados: asociación predominante del tabaquismo con los pacientes triple positivos, y con el FR en los restantes pacientes positivos para uno o dos autoanticuerpos.

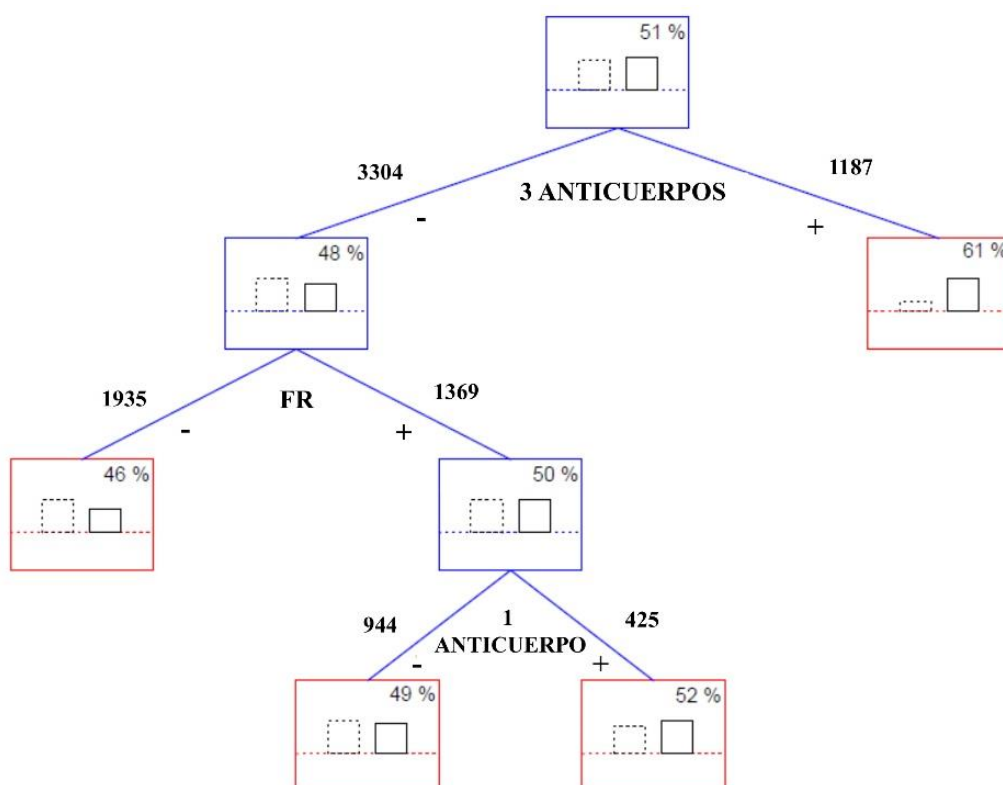


Figura 18. Árbol de clasificación de los pacientes fumadores y no fumadores de acuerdo a la presencia de autoanticuerpos. Se muestra el mejor árbol de clasificación obtenido para diferenciar a los pacientes fumadores de los no fumadores de acuerdo al estado de los autoanticuerpos y sus combinaciones. En cada nodo se representa un histograma con la frecuencia de los pacientes fumadores (línea continua) y de los no fumadores (línea discontinua). La frecuencia de los fumadores aparece también indicada numéricamente con el porcentaje. Se indican los anticuerpos seleccionados en cada una de las divisiones, y encima de cada nodo el estatus necesario (positivo o negativo) para alcanzar el siguiente nivel, junto con el número de pacientes que fueron pasando en cada división. El nodo raíz y los nodos internos están representados en azul, y los nodos terminales en rojo.

CAPÍTULO 3.

Valor predictivo de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con EA, y su contribución en la clasificación de los pacientes con AR.

Value of measuring anti-Carbamylated protein antibodies for classification on early arthritis patients.

Cristina Regueiro, Laura Nuño, Ana M Ortiz, Diana Peiteado, Alejandro Villalba, Dora Pascual-Salcedo, Ana Martínez-Feito, Isidoro González-Álvaro, Alejandro Balsa, Antonio González.

Regueiro C, Nuño L, Ortiz AM, et al. Sci Rep. 2017;7(1):12023. doi:10.1038/s41598-017-09657-5. Anexo 2.

Improved RA classification among early arthritis patients with the concordant presence of three RA autoantibodies: analysis in two early arthritis clinics.

Cristina Regueiro, Lorena Rodríguez-Martínez, Laura Nuño, Ana M Ortiz, Alejandro Villalba, Dora Pascual-Salcedo, Ana Martínez-Feito, Isidoro González-Álvaro, Alejandro Balsa, Antonio González.

Regueiro C, Rodríguez-Martínez L, Nuño L, et al. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):280. doi:10.1186/s13075-019-2079-4. Anexo 3.



3.1 Prevalencia de autoanticuerpos y características de los pacientes incluidos.

Los pacientes con EA que habían completado dos años de seguimiento y que disponían de una muestra de suero de la consulta basal se utilizaron para evaluar el papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de los pacientes. En total, 1062 pacientes procedentes de la cohorte IDIPAZ (n = 525) y de la cohorte PEARL (n = 537). Las características de los pacientes y la comparación entre las dos cohortes se recogen en la Tabla 14. Los pacientes de cada una de las cohortes no mostraron diferencias importantes, aunque los pacientes de la cohorte IDIPAZ fueron más jóvenes, incluyeron más fumadores y presentaron una artritis más temprana. Respecto a la cohorte IDIPAZ, los pacientes incluidos en la cohorte PEARL se caracterizaron por presentar un mayor porcentaje de mujeres.

Tabla 14. Características y comparación de los pacientes de las dos cohortes de pacientes con EA. En la tabla se muestran las características clínicas y serológicas de todos los pacientes y de aquellos incluidos en cada una de las dos cohortes. Los *P* valores son el resultado de la comparación de ambas cohortes. Los pacientes fueron clasificados al final del seguimiento con AR, AI u otras enfermedades.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL (n = 1062)	IDIPAZ (n = 525)	PEARL (n = 537)	<i>P</i>
Mujeres (%)	818 (77.0)	389 (74.1)	429 (79.9)	0.025
Edad inicio de los síntomas, mediana (IQR)	52 (40-65)	50 (39-65)	54 (42-66)	0.015
Semanas de evolución, mediana (IQR)	16 (8-28)	12 (6-22)	21 (12-34)	< 0.001
Fumadores (%)	444 (45.1)	222 (46.5)	222 (43.8)	0.001
FR positivos (%)	444 (41.8)	217 (41.3)	227 (42.3)	0.757
ACPA positivos (%)	395 (37.8)	201 (38.3)	194 (36.1)	0.726
Anti-CarP positivos (%)	291 (27.4)	146 (27.8)	145 (27.0)	0.768
AR (%)	530 (49.9)	252 (48.0)	278 (51.8)	0.219
AI (%)	212 (20.0)	90 (17.1)	122 (22.7)	0.023
Otros diagnósticos (%)	320 (30.1)	183 (34.9)	137 (25.5)	< 0.001

Casi la mitad de los pacientes (49.9 %) fueron clasificados como AR al final de los dos años de seguimiento. El resto fue clasificado con otras enfermedades, incluyendo la AI como la más frecuente (20.0 %) y otros diagnósticos menos comunes como la espondiloartritis, el SS, el LES, la artritis psoriásica o la enfermedad inflamatoria intestinal. Todos estos diagnósticos alternativos juntos representaron el 30.1 % del total, y aquí se incluyeron en el grupo de los pacientes con EA y otras enfermedades (OEA).

Los pacientes clasificados con AR y los pacientes sin esta enfermedad (AI y OEA) mostraron características basales diferentes (Tabla 15). Los pacientes con AR presentaron una mayor edad de inicio, una mayor duración de los síntomas, y tuvieron más actividad de la enfermedad y más frecuencia de erosiones. La frecuencia de autoanticuerpos también fue mayor en los pacientes con AR. Los anticuerpos anti-CarP se encontraron en el 27.4 % de los pacientes con EA y en el 41.9 % de los clasificados como AR. En los pacientes clasificados con otras enfermedades el porcentaje de positivos para los anticuerpos anti-CarP fue más bajo (13.0 %), sin mostrar diferencias entre los clasificados con AI (13.8 %) y los incluidos en el grupo OEA (11.8 %) (Figura 19).

Tabla 15. Comparación de los pacientes con AR y sin AR en el conjunto de las dos cohortes de EA. En la tabla se muestran las características clínicas y serológicas de los pacientes diagnosticados con o sin AR. Los *P* valores son el resultado de la comparación entre ambos grupos.

CARACTERÍSTICAS	AR (n=530)	no AR (n=532)	<i>P</i>
Mujeres (%)	420 (79.2)	398 (74.8)	0.09
Años de inicio de los síntomas, mediana (IQR)	54 (43-67)	49 (37-64)	2.5×10^{-5}
Semanas de evolución, mediana (IQR)	20 (11-3)	12 (6-24)	6.3×10^{-4}
Fumadores (%)	234 (46.0)	210 (44.2)	0.6
FR positivos (%)	358 (67.5)	86 (16.2)	6.4×10^{-65}
ACPA positivos (%)	349 (66.3)	46 (8.8)	2.7×10^{-82}
Anti-CarP positivos (%)	222 (41.9)	69 (13.0)	6.7×10^{-24}
DAS28, mediana (IQR)	5.2 (3.9-6.3)	3.9 (2.9-4.9)	7.0×10^{-34}
Erosiones (%)	77 (14.6)	16 (4.5)	6.5×10^{-6}

En los pacientes con AR los títulos de los anticuerpos anti-CarP mostraron una correlación significativa pero modesta con los títulos de los ACPA ($r_s = 0.40$, IC 95 %: 0.32-0.48) y del FR ($r_s = 0.36$, IC 95 %: 0.28-0.44). Más notable fue la concordancia del estado positivo/negativo de los anticuerpos anti-CarP con los otros dos tipos de autoanticuerpos ($\gamma = 0.70$, IC 95 %: 0.58-0.81 con los ACPA, y $\gamma = 0.70$, IC 95 %: 0.59-0.82 con el FR), aunque claramente inferior al nivel de concordancia entre los ACPA y el FR ($\gamma = 0.89$, IC 95 %: 0.85-0.94). En los pacientes sin AR los niveles de concordancia fueron más bajos y, de nuevo, los anticuerpos anti-CarP mostraron una concordancia con los ACPA ($\gamma = 0.39$, IC 95 %: 0.70-0.08) y con el FR ($\gamma = 0.52$, IC 95 %: 0.31-0.73) inferior a la presentada entre estos dos

últimos anticuerpos ($\gamma = 0.74$, IC 95 %: 0.60-0.88). A pesar de esta coexistencia, cuando se realizó un análisis multivariante incluyendo a los tres autoanticuerpos, los anti-CarP se asociaron de manera independiente con la AR al final del seguimiento (OR = 1.7, IC 95 %: 1.1-2.6, $p = 0.009$), aunque esta asociación fue mucho más débil que la mostrada por los ACPA (OR = 11.3, IC 95 %: 7.4-17.2, $p = 3.5 \times 10^{-29}$) y por el FR (OR = 2.9, IC 95 %: 2.0-4.3, $p = 2.9 \times 10^{-8}$).

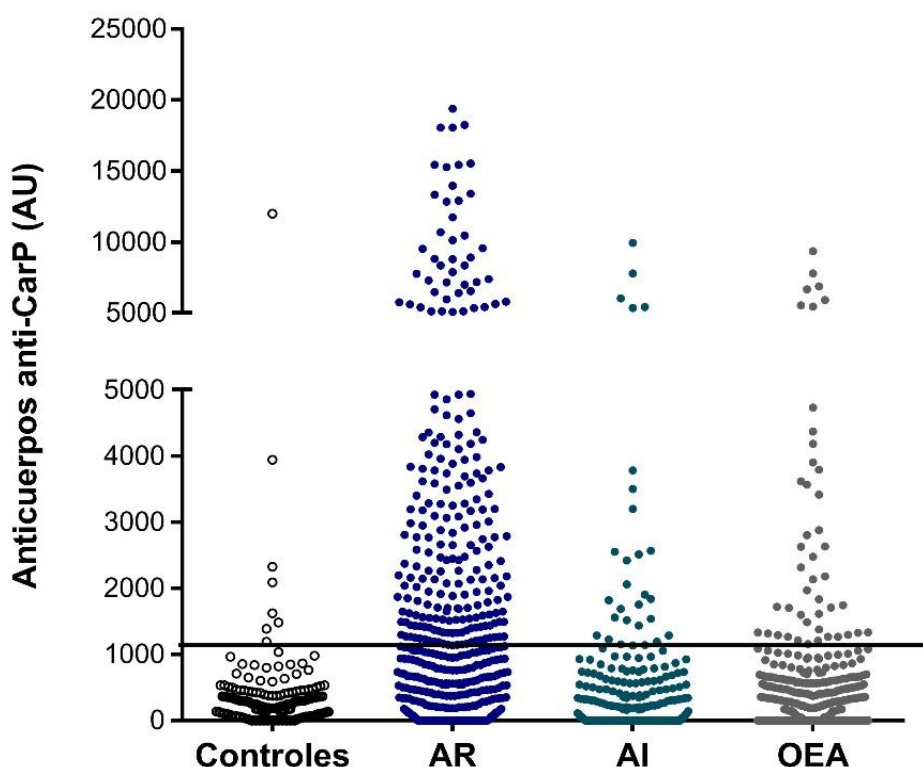


Figura 19. Títulos de los anticuerpos anti-CarP en los controles sanos y en los pacientes clasificados con AR, AI y OEA al final del seguimiento. En el gráfico se representan los títulos de los controles sanos y de los pacientes con EA estratificados de acuerdo a la clasificación al final del seguimiento: AR, AI y OEA. Cada punto representa el título de un individuo, y la línea horizontal el punto de corte establecido para determinar la positividad.

3.2. Valor diagnóstico de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con EA.

La capacidad de los anticuerpos anti-CarP para clasificar de forma correcta a los pacientes con AR se evaluó con los parámetros normalmente utilizados en la valoración de los marcadores diagnósticos: sensibilidad, especificidad, valores predictivos, razones de verosimilitud y AUC de las curvas ROC.

Los primeros parámetros utilizados fueron la sensibilidad y la especificidad. Los anticuerpos anti-CarP fueron los menos sensibles (41.9), tanto en comparación con los ACPA (66.3) como con el FR (67.5) (Tabla 16). Sin embargo, su valor de especificidad fue bastante alto (87.0), incluso similar a la especificidad de los ACPA (Tabla 16). En el conjunto de pacientes ACPA⁻ la sensibilidad de los anticuerpos anti-CarP disminuyó y fue inferior a la sensibilidad del FR (Tabla 16). En los pacientes doble negativos la sensibilidad de los anticuerpos anti-CarP disminuyó todavía más (9.4). Por el contrario, la especificidad de los anticuerpos anti-CarP se mantuvo bastante alta, tanto en el grupo de pacientes ACPA⁻ (87.8) como en los pacientes en ACPA⁻FR⁻ (89.8) (Tabla 16). El verdadero papel de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR vendría determinado por su contribución sobre la combinación de autoanticuerpos utilizada en los criterios de clasificación actuales. Los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 tienen en cuenta la serología positiva para los ACPA o el FR. En consecuencia, para considerar a los anticuerpos anti-CarP como buenos biomarcadores, su inclusión en la combinación de “ACPA o FR” debería incrementar el valor de sensibilidad sin suponer grandes pérdidas de especificidad. La inclusión de los anticuerpos anti-CarP sobre esta combinación incrementó la sensibilidad un 2.2 %, con un coste de especificidad del 8.1 % (diferencia entre las columnas “ACPA o FR” y “ACPA o FR o anti-CarP” de la Tabla 16). La aportación de estos anticuerpos fue algo más notable en los subgrupos de pacientes ACPA⁻ y ACPA⁻FR⁻, con una ganancia de sensibilidad del 6.8 y 9.4 % respectivamente, y sin pérdidas en los valores de especificidad (Tabla 16).

Los siguientes parámetros examinados fueron los valores predictivos y las razones de verosimilitud. Los valores predictivos de los anticuerpos anti-CarP fueron inferiores a los de los ACPA y el FR (Tabla 16). Al incluir a los anticuerpos anti-CarP en la combinación de “ACPA o FR” el VPN apenas se modificó (75.6 vs. 75.3 sin incluir e incluyendo a los anti-CarP, respectivamente), mientras que el VPP disminuyó del 78.9 % al 73.4 % al incluir a los anti-CarP (Tabla 16). Las razones de verosimilitud para los anticuerpos anti-CarP fueron peores que las de los ACPA y el FR (Tabla 16). La inclusión de los anticuerpos anti-CarP con la combinación de “ACPA o FR” produjo una disminución de la RV⁺ (3.2 vs 2.7 sin incluir e incluyendo a los anti-CarP, respectivamente), sin modificar el valor de la RV⁻ (0.3 en ambos casos) (Tabla 16). En los pacientes ACPA⁻ y ACPA⁻FR⁻ la capacidad de los anticuerpos anti-CarP para clasificar la AR fue bastante modesta (Tabla 16). Esta limitación fue especialmente notable en los VPP, con valores bajos tanto en los ACPA⁻ (34.8) como en los ACPA⁻FR⁻ (22.2).

RESULTADOS

Por último, también se analizaron las curvas ROC para calcular el valor de AUC de cada uno de los anticuerpos y combinaciones estudiadas (Tabla 16). Los resultados mostraron que la incorporación de los anticuerpos anti-CarP no mejoró la clasificación de los pacientes respecto a la combinación utilizada en los criterios de clasificación actuales (AUC: 0.77 vs. 0.74 sin incluir e incluyendo a los anti-CarP, respectivamente).

Tabla 16. Parámetros utilizados para evaluar el valor diagnóstico de los distintos anticuerpos y sus combinaciones. En la tabla se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, RV+, RV- y AUC de los distintos anticuerpos y sus combinaciones en el conjunto de pacientes con AR, en el subgrupo ACPA⁻ y en los ACPA⁻/FR⁻.

	Anti-CarP	ACPA	FR	ACPA o FR	ACPA o FR o Anti-CarP
Sensibilidad					
Todos los pacientes	41.9	66.3	67.5	75.9	78.1
ACPA ⁻	17.5	na	28.2	28.2 ^a	35.0
ACPA ⁻ /FR ⁻	9.4	na	na	na	9.4 ^a
Especificidad					
Todos los pacientes	87.0	91.2	83.8	79.4	71.3
ACPA ⁻	87.8	na	87.1	87.1 ^a	78.3
ACPA ⁻ /FR ⁻	89.8	na	na	na	89.8 ^a
VPP					
Todos los pacientes	76.3	88.4	80.6	78.9	73.4
ACPA ⁻	34.8	na	45.0	45.0 ^a	37.6
ACPA ⁻ /FR ⁻	22.2	na	na	na	22.2 ^a
VPN					
Todos los pacientes	60.1	72.8	72.2	76.5	76.3
ACPA ⁻	74.0	na	76.5	76.5 ^a	76.3
ACPA ⁻ /FR ⁻	76.3	na	na	na	76.3 ^a
RV+					
Todos los pacientes	3.2	7.5	4.2	3.7	2.7
ACPA ⁻	1.4	na	2.2	2.2 ^a	1.6
ACPA ⁻ /FR ⁻	0.9	na	na	na	0.9 ^a
RV-					
Todos los pacientes	0.7	0.4	0.4	0.3	0.3
ACPA ⁻	0.9	na	0.8	0.8 ^a	0.8
ACPA ⁻ /FR ⁻	1.0	na	na	na	1.0 ^a
AUC					
Todos los pacientes	0.65	0.79	0.76	0.77	0.74
ACPA ⁻	0.53	na	0.58	0.58 ^a	0.57
ACPA ⁻ /FR ⁻	0.49	na	na	na	0.49 ^a

^aValores repetidos, representados más de una vez en la tabla, pero indicados para facilitar las comparaciones.
na: no aplicable.

3.3. Contribución de los anticuerpos anti-CarP a la clasificación de los pacientes con AR.

La incorporación de los anticuerpos anti-CarP no supuso una mejoría respecto a la combinación de anticuerpos utilizada en los criterios de clasificación actuales. Sin embargo, en los criterios ACR/EULAR 2010 no solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia de los ACPA o el FR, sino que también se valora el título de estos anticuerpos. Así, los pacientes con títulos altos y los pacientes con títulos bajos se ponderan de manera distinta. A los primeros se les puntúa con 3 puntos y a los segundos con 2. Por lo tanto, para conocer la contribución real de los anticuerpos anti-CarP sobre los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 se realizaron nuevos análisis estratificando a los anticuerpos en función del nivel de sus títulos.

Los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP se asociaron significativamente con la clasificación como AR al final del seguimiento (OR = 7.1, IC 95 %: 4.5-11.1) (Tabla 17). Sin embargo, esta asociación fue mucho más baja que la de los títulos altos de los “ACPA o FR” (OR = 36.4, IC 95 %: 19.6-67.3). Los títulos bajos de los anticuerpos anti-CarP también se asociaron significativamente con la clasificación como AR (OR = 3.9, IC 95 %: 2.6-5.8), aunque con un efecto que no fue muy diferente al de los títulos altos. Además, la asociación de los títulos bajos de los anticuerpos anti-CarP no fue diferente de la asociación de los títulos bajos de “ACPA o FR”. En consecuencia, los títulos altos y bajos de los anticuerpos anti-CarP tendrían un peso similar en la clasificación de la AR, y su efecto sería semejante al efecto de los títulos bajos de los “ACPA o FR”.

Tabla 17. Asociación de los distintos autoanticuerpos con la clasificación de la AR en función de sus títulos. En la tabla se muestra la OR con el IC 95% y el P valor, resultantes de la regresión logística.

Serología	Comparación	OR (IC 95 %)	P
ACPA o RF	bajo vs. negativo	5.1 (3.5 - 7.3)	1.3×10^{-18}
ACPA o RF	alto vs. negativo	36.4 (19.6 - 67.3)	3.2×10^{-30}
anti-CarP	bajo vs. negativo	3.9 (2.6 - 5.8)	2.4×10^{-11}
anti-CarP	alto vs. negativo	7.1 (4.5 - 11.1)	1.1×10^{-17}

Por último, se utilizaron métodos exploratorios basados en árboles de clasificación para crear un modelo predictivo que reflejase la mejor combinación de anticuerpos en la clasificación de la AR (Figura 20). Los ACPA fueron los primeros anticuerpos utilizados para

dividir el árbol, quedando definidos como los mejores biomarcadores de clasificación de la AR. El FR fue el anticuerpo que apareció en la siguiente división del árbol. En esta segunda división el FR consiguió incrementar la sensibilidad al aumentar el número de pacientes clasificados correctamente como AR. Los anticuerpos anti-CarP aparecieron tras dos divisiones más, en un árbol grande con un total de 7 nodos terminales. Los anticuerpos anti-CarP no mejoraron la sensibilidad, únicamente incrementaron un poco la especificidad del modelo al aumentar el número de pacientes sin AR clasificados correctamente.

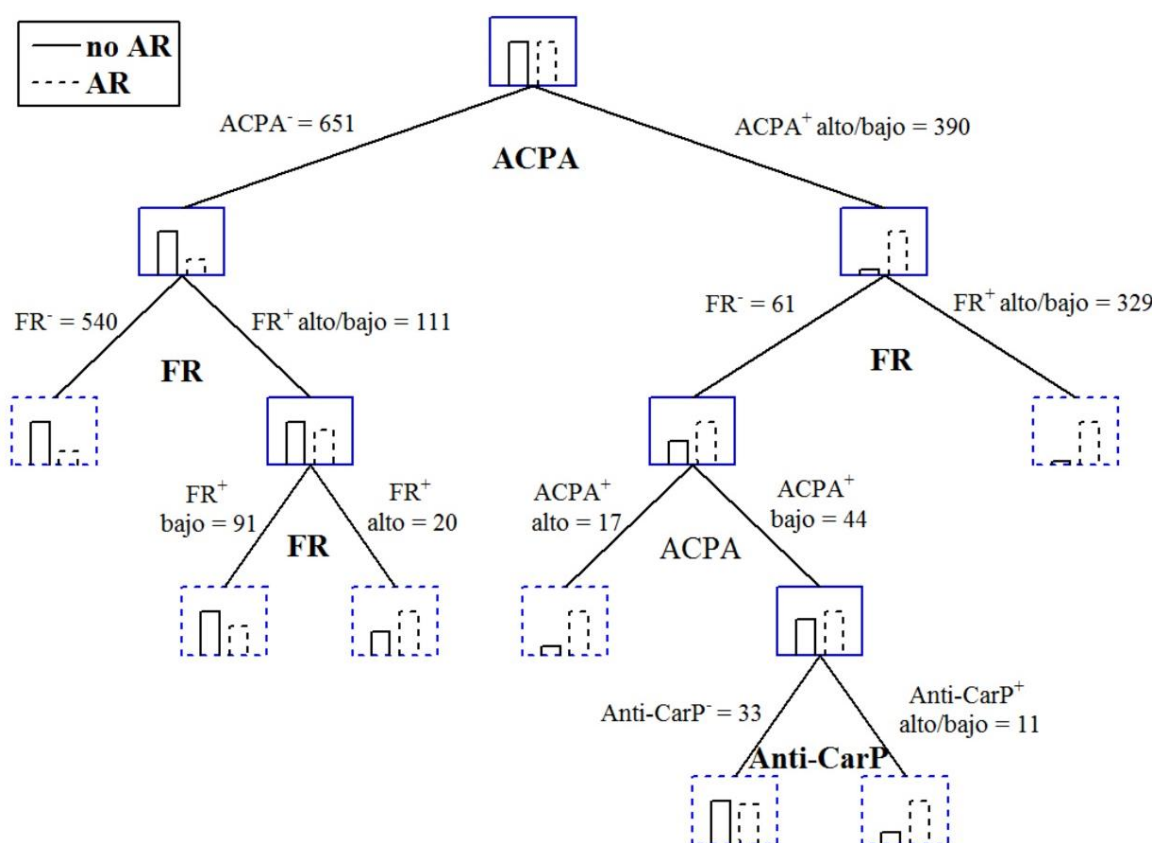


Figura 20. Árbol de clasificación de los pacientes con EA. Se muestra el árbol más pequeño que permitió observar una división basada en los anticuerpos anti-CarP. El árbol se dejó crecer hasta que menos de 15 pacientes se clasificaron como AR o no AR. En cada nodo se muestra un histograma que representa el porcentaje de pacientes con AR (línea discontinua) y sin AR (línea continua) clasificados en ese nivel del árbol. Se indican los anticuerpos seleccionados en cada una de las divisiones, y encima de cada nodo el estatus de anticuerpo necesario para alcanzar el siguiente nivel junto con el número de pacientes que fueron pasando en cada división. El nodo raíz y los nodos internos están representados en línea continua, y los nodos terminales en línea discontinua.

3.4. Contribución de la presencia concordante de autoanticuerpos a la clasificación de los pacientes con AR.

Los resultados anteriores reflejan que la incorporación de los anticuerpos anti-CarP de forma similar a como se consideran los otros anticuerpos en los criterios ACR/EULAR 2010, no mejora significativamente la clasificación de los pacientes con AR. Sin embargo, la elevada especificidad de la triple positividad para los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP demostrada en el estudio de *Verhuel MK y col.*²⁰⁸, abre puertas a considerar el beneficio que pueden aportar los anticuerpos anti-CarP a través de la concordancia entre anticuerpos.

Para evaluar el papel de la concordancia se diseñaron dos modelos, el modelo ACR/EULAR 2010 y el modelo de la concordancia. En el modelo ACR/EULAR 2010 los pacientes se estratificaron en tres niveles: el nivel con puntuación 3 para los pacientes con títulos altos de ACPA o FR, el nivel con puntuación 2 para los pacientes con títulos bajos de ACPA o FR, y el nivel con puntuación 0 para los pacientes negativos. En el modelo de la concordancia los pacientes se dividieron en cuatro niveles: el nivel con los pacientes positivos para 3 anticuerpos, el nivel con los pacientes positivos para dos anticuerpos, el nivel con los pacientes positivos para un anticuerpo y el nivel con los pacientes triple negativos. El VPP para la clasificación de AR se calculó en cada uno de los grupos. El estrato correspondiente a la triple positividad fue el que mostró el VPP más alto (96.1) (Tabla 18). Este resultado indica que la triple positividad sería el mejor criterio para clasificar correctamente a los pacientes con AR, independientemente del nivel de los títulos de los distintos anticuerpos. La importancia de la concordancia entre autoanticuerpos también se demostró al analizar la asociación de cada nivel con la AR (Tabla 19). La OR en el nivel de la triple positividad fue grande, y bastante mayor que la OR en el nivel con puntuación 3 del modelo ACR/EULAR 2010 (OR = 80.9, IC 95 %: 37.1 – 177.1 vs. OR = 26.1, IC 95 %: 18.0 – 37.8) (Tabla 19).

Tabla 18. Clasificación de los pacientes con EA siguiendo los criterios ACR/EULAR 2010 o la concordancia entre anticuerpos. Se muestran los VPP de cada uno de los niveles generados en cada modelo de clasificación.

ACR/EULAR 2010				CONCORDANCIA			
Puntuación	AR	no AR	VPP	Nivel	AR	no AR	VPP
3	350	44	88.8%	3 Ac	174	7	96.1%
2	47	64	42.3%	2 Ac	167	36	82.3%
-	-	-	-	1 Ac	68	107	38.9%
0	129	423	23.4%	0 Ac	117	381	23.5%

Tabla 19. Asociación de los niveles de cada modelo con la AR al final del seguimiento. Se muestran los valores para el modelo basado en los criterios ACR/EULAR 2010, en la concordancia (Ccd.) y en la unión de ambos modelos, con (2010 + Ccd.) o sin el estrado correspondiente a la positividad para un solo anticuerpo (2010 + Ccd.').

Nivel	ACR/EULAR 2010	CONCORDANCIA	2010 + Ccd.	2010 + Ccd.'
	OR (IC 95 %)	OR (IC 95 %)	OR (IC 95 %)	OR (IC 95 %)
3	26.1 (18.0-37.8)	-	7.5 (3.3-17.0)	7.0 (4.0-12.2)
2	2.4 (1.6-3.7)	-	1.7 (0.8-3.7) ^a	1.6 (1.0-2.6) ^a
3 Ac	-	80.9 (37.0-177.1)	11.4 (3.7-35.2)	12.2 (4.9-30.2)
2 Ac	-	15.1 (10.0-22.9)	2.8 (1.2-6.8)	3.0 (1.7-5.3)
1 Ac	-	2.1 (1.4-3.0)	0.9 (0.5-1.8) ^a	-

^aNiveles que no mostraron una asociación significativa con la clasificación de la AR.

El valor de la triple positividad en la clasificación de la AR también se demostró en el modelo que incluyó tanto a los criterios ACR/EULAR 2010 como a la concordancia entre anticuerpos. En este nuevo modelo los pacientes se estratificaron en cinco categorías: los pacientes con títulos altos de ACPA o FR, los pacientes con títulos bajos de ACPA o FR, los pacientes positivos para 3 anticuerpos, los pacientes positivos para dos anticuerpos, los pacientes positivos para un anticuerpo y la categoría con los pacientes negativos. La categoría con los pacientes triple positivos fue la más asociada con la AR, seguida de la categoría con títulos altos de ACPA o FR, la caracterizada por la presencia de dos anticuerpos, la de los títulos positivos bajos de ACPA o FR y la correspondiente a la positividad para un único anticuerpo (Tabla 19). Debido a la falta de asociación significativa de esta última categoría, se

diseñó un modelo similar, excluyendo a los pacientes positivos para un solo autoanticuerpo (Tabla 19). Los resultados fueron similares, con la OR mayor correspondiente a la triple positividad. A mayores, se estimó la asociación entre la AR y las categorías resultantes de la combinación de los criterios ACR/EULAR 2010 y la concordancia entre anticuerpos (Figura 21). La OR mayor fue la correspondiente a la categoría de los pacientes con títulos altos de ACPA o FR y positivos para los tres autoanticuerpos (OR = 94.0 IC 95 %: 40.7 – 217.2). Así, todos estos resultados remarcan la contribución de la concordancia a la clasificación de la AR y sugieren que incluir a la triple positividad en los criterios ACR/EULAR 2010 podría mejorar la clasificación de los pacientes.

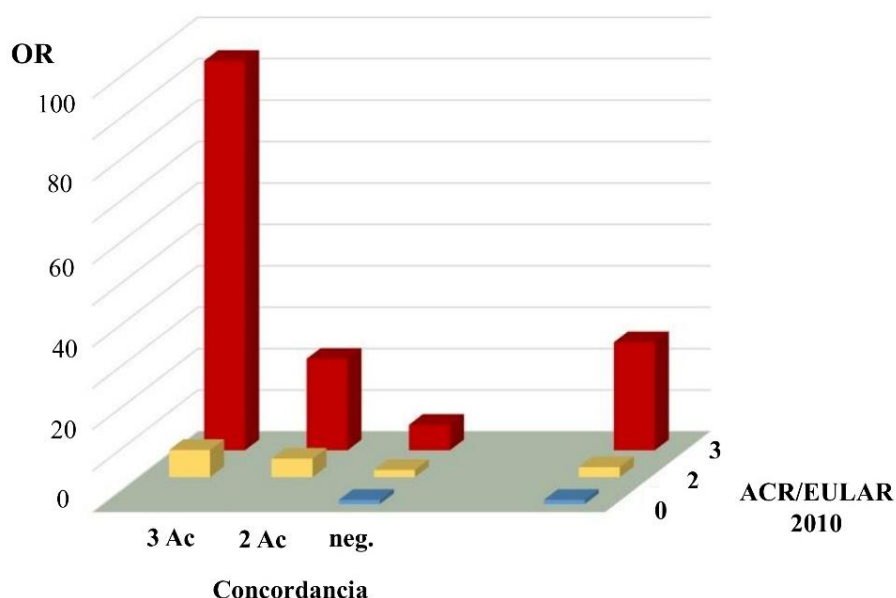


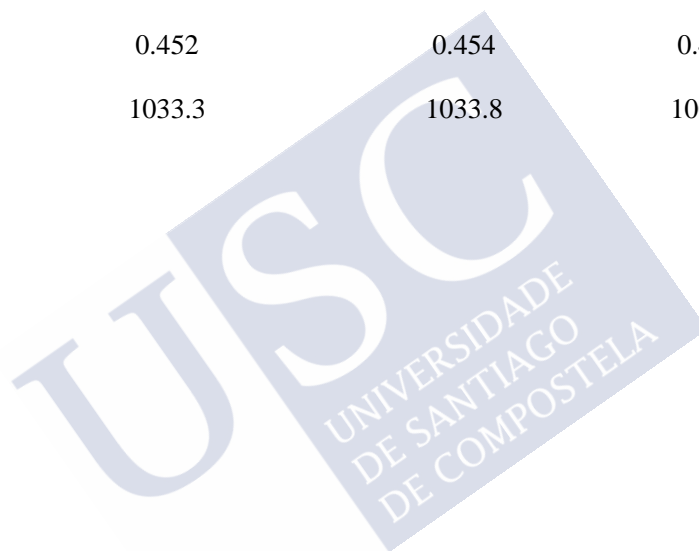
Figura 21. Representación de las OR resultantes de la combinación de los criterios ACR/EULAR 2010 y la concordancia entre anticuerpos.

Por último, el beneficio de incluir a la concordancia entre anticuerpos en la clasificación de los pacientes también se reflejó al estimar la calidad de los distintos modelos diseñados. La calidad de los modelos se evaluó con los estadísticos R^2 y AIC. El modelo ACR/EULAR 2010 y el modelo de la concordancia presentaron valores de R^2 y AIC parecidos, lo que indica que ambos modelos presentan una calidad similar (Tabla 20). En contraste, el modelo formado por la combinación de los criterios ACR/EULAR 2010 y la concordancia presentó un R^2 mayor y un AIC más pequeño (Tabla 20). Específicamente, el AIC del modelo combinado fue 30 unidades menor que el AIC del modelo ACR/EULAR 2010 o del modelo de la concordancia. Una diferencia en el AIC de 10 unidades ya es suficiente para considerar a

un modelo mejor que otro²³⁸. Por lo tanto, los resultados demuestran que el modelo combinado sería el mejor modelo para clasificar a los pacientes con AR. Además, el R^2 y AIC de los dos modelos combinados (el que incluye a los pacientes positivos para un solo anticuerpo y el que lo excluye) fueron similares, indicando que ninguno de ellos es mejor que el otro.

Tabla 20. Calidad de cada uno de los modelos diseñados. Se muestran los valores de R^2 y AIC para el modelo basado en los criterios ACR/EULAR 2010, en la concordancia (Ccd.) y en la unión de ambos modelos, con (2010 + Ccd.) o sin el estrado correspondiente a la positividad para un solo anticuerpo (2010 + Ccd.').

ESTADÍSTICO	ACR/EULAR 2010	CONCORDANCIA	2010 + Ccd.	2010 + Ccd.'
R^2	0.452	0.454	0.483	0.483
AIC	1033.3	1033.8	1001.8	999.9





CAPÍTULO 4.

Asociación de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad de la enfermedad y una peor capacidad funcional con predominio en los pacientes más jóvenes.





4.1 Mayor actividad de la AR y mayor incapacidad funcional en los pacientes con EA que son anti-CarP positivos.

Los pacientes incluidos en este análisis coinciden con los utilizados en el estudio del valor de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR. Por ello, sus características clínicas ya han sido presentadas en la Tabla 14. Aquí es conveniente recordar el porcentaje de pacientes positivos para los anticuerpos anti-CarP, del 28.1 %. Un porcentaje que fue inferior al de los ACPA (37.4 %) y el FR (42.5 %). La actividad de la enfermedad ya era moderada al inicio del estudio (DAS28 = 4.4), y se fue reduciendo en cada una de las siguientes visitas (DAS28 = 3.0). Este control de la enfermedad también se refleja en el porcentaje de pacientes con una actividad alta (DAS28 > 5.1), que fue del 33.8 % al inicio, y ≤ 9.2 % durante el seguimiento. El HAQ mostró un patrón similar, presentando un valor moderado al inicio (HAQ = 1.00), que disminuyó en las visitas posteriores (HAQ = 0.38).

Los pacientes anti-CarP positivos mostraron una mayor actividad e incapacidad funcional que los pacientes negativos (Tabla 21). De esta forma, el valor medio del DAS28 basal en los pacientes positivos (4.94, SD = 0.09) fue mayor que el de los negativos (4.30, SD = 0.06), y de manera similar, la media del HAQ de la primera visita también fue mayor en los pacientes anti-CarP positivos (1.18, SD = 0.05 vs. 1.03, SD = 0.03). Además, estas diferencias se mantuvieron significativas en el análisis univariante, en el análisis ajustado por las variables de confusión, y en el modelo incluyendo a los ACPA y al FR (Tabla 21).

Tabla 21. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad y la incapacidad funcional de los pacientes con EA. En la tabla se muestra la asociación con el DAS28 y el HAQ sin ajustar o ajustando por sexo, edad y la cohorte. En algunos análisis también se incluyeron a los ACPA, al FR o a ambos.

	AJUSTE	β	SE	p valor
DAS28	no	0.18	0.03	8.9×10^{-9}
	sí	0.18	0.03	9.1×10^{-9}
	sí + ACPA	0.13	0.03	7.1×10^{-5}
	sí + FR	0.15	0.03	1.3×10^{-5}
	sí + ACPA & RF	0.13	0.03	1.3×10^{-4}
HAQ	no	0.09	0.03	0.008
	sí	0.08	0.03	0.008
	sí + ACPA	0.07	0.03	0.04
	sí + FR	0.09	0.03	0.008
	sí + ACPA & RF	0.08	0.04	0.02

4.2 Mayor actividad de la enfermedad en los pacientes anti-CarP positivos que habían comenzado con artritis más jóvenes.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con el DAS28 basal de los pacientes con EA se analizó con más detalle. En este análisis más detallado se incluyeron en el modelo las interacciones entre los anticuerpos anti-CarP y otras variables clínicas o demográficas de los pacientes (como el sexo, la edad, el tiempo de evolución, el tabaquismo, la cohorte, los ACPA o el FR). La única interacción asociada significativamente con el DAS28 al inicio fue aquella establecida entre los anticuerpos anti-CarP y la edad en la primera visita (Tabla 22). Como resultado de esta interacción, la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad fue mucho más marcada en los pacientes de menor edad (Figura 22). En consecuencia, el DAS28 de los pacientes anti-CarP positivos con ≤ 30 años fue 1.98 unidades mayor que el de los negativos (5.60 vs. 3.62, $p = 3.8 \times 10^{-6}$, $n = 81$). En contraste, esta diferencia fue solo de 0.33 unidades en los pacientes mayores de 60 años (5.02 vs. 4.69, $p = 0.093$, $n = 338$). Además, este análisis reveló que el DAS28 basal de los pacientes anti-CarP negativos se incrementaba con la edad, mostrando este índice una correlación significativa con la edad en este grupo de pacientes ($r = 0.25$, $p = 2.0 \times 10^{-11}$). Por el contrario, el DAS28 no mostró una correlación significativa con la edad de los pacientes anti-CarP positivos ($r = -0.02$, $p = 0.8$, Figura 22).

Tabla 22. Análisis de la asociación entre la actividad de la enfermedad en los pacientes con EA y la presencia de los anticuerpos y su interacción con la edad. Se muestran los resultados de los modelos de regresión lineal con cada uno de los anticuerpos por separado y de cada uno de los anticuerpos y su interacción con la edad en los modelos condicionados por los otros dos autoanticuerpos.

	Término del anticuerpo			Término de la interacción		
	β	SE	p	β	SE	p
Anti-CarP	0.55	0.11	5.5×10^{-7}	0.44	0.12	0.0004
ACPA	0.41	0.11	0.00014	0.28	0.12	0.018
FR	0.33	0.11	0.0019	0.22	0.11	0.056
Anti-CarP + ACPA & FR	0.47	0.12	8.1×10^{-5}	0.40	0.14	0.003
ACPA + Anti-CarP & FR	0.26	0.14	0.068	0.18	0.16	0.26
FR + ACPA & Anti-CarP	0.03	0.14	0.84	0.05	0.15	0.76

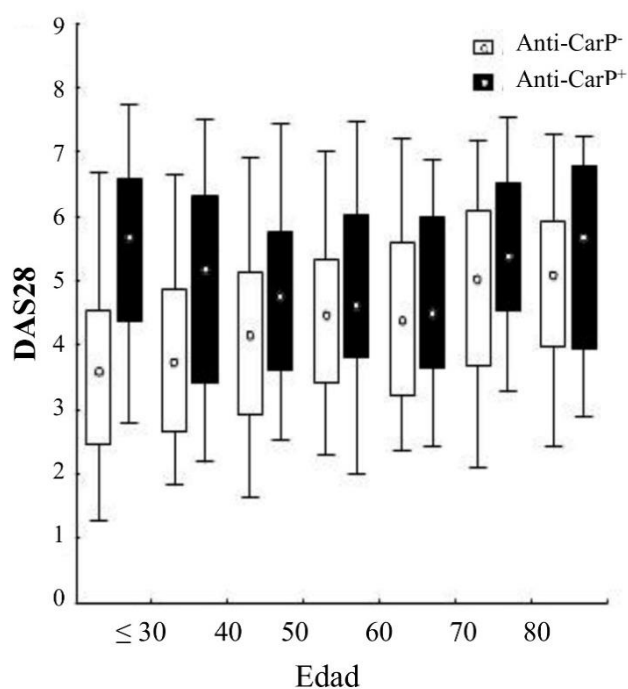


Figura 22. Mayor grado de actividad en los pacientes anti-CarP positivos de menor edad. En la gráfica se muestra la mediana (punto vacío), el rango intercuartílico y el intervalo de confianza del 95 % del DAS28 en los pacientes anti-CarP positivos (negro) y negativos (blanco) estratificados por edad.

La interacción entre los anticuerpos anti-CarP y la edad no fue atribuible a la asociación entre ambos factores, ya que la edad al inicio no fue diferente entre los pacientes anti-CarP positivos y anti-CarP negativos ($p = 0.22$). Además, la interacción fue independiente de la presencia de los ACPA y el FR (Tabla 22), de la presencia de erosiones al inicio ($\beta = 0.14$, $SE = 0.03$, $p = 0.00002$), de la clasificación de los pacientes al inicio del estudio ($\beta = 0.38$, $SE = 0.10$, $p = 0.0002$) y de la clasificación de los pacientes al final del seguimiento ($\beta = 0.45$, $SE = 0.10$, $p = 0.00002$). La independencia de esta interacción respecto al resto de autoanticuerpos también se vio reflejada al analizar los grupos de pacientes positivos únicamente para cada uno de los tres anticuerpos (Figura 23). El valor elevado del DAS28 en los pacientes más jóvenes (≤ 40 años) solo se observó en los que fueron anti-CarP⁺/ACPA⁻/FR⁻. El DAS28 de este subgrupo de pacientes mostró una media de 5.08 ($SD = 1.62$), que fue significativamente mayor que la media de los triple negativos de la misma edad (3.52, $SD = 1.46$, $p = 0.00014$). En contraste, los pacientes con ≤ 40 años anti-CarP⁻/ACPA⁺/FR⁻ y anti-CarP⁻/ACPA⁻/FR⁺ no mostraron un valor de DAS28 superior que el de los triple negativos (4.23, $SD = 1.04$, $p = 0.079$ y 3.90, $SD = 1.20$, $p = 0.37$, respectivamente).

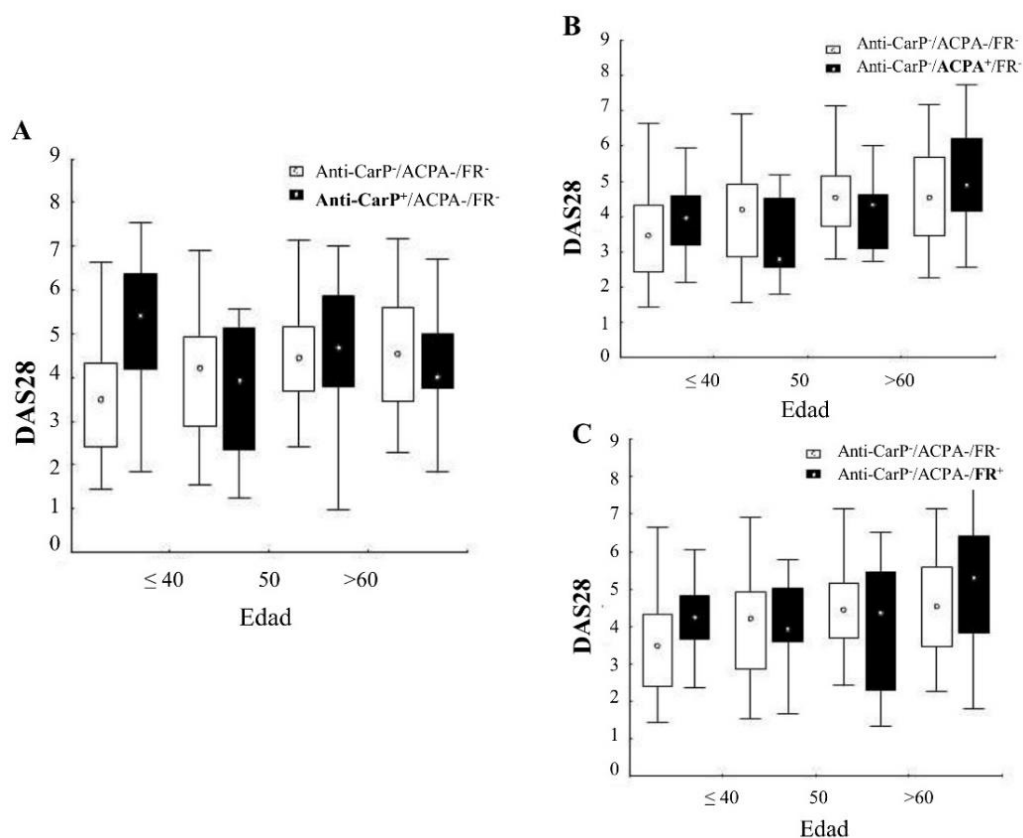


Figura 23. Asociación específica de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad de la enfermedad en los pacientes de menor edad. En la gráfica se muestra la mediana (punto vacío), el rango intercuartílico y el intervalo de confianza del 95 % del DAS28 de los pacientes triple negativos (blanco), comparados con los pacientes anti-CarP⁺/ACPA⁻/RF⁻ en A., anti-CarP⁺/ACPA⁺/RF⁻ en B, y anti-CarP⁺/ACPA⁻/RF⁺ en C (negro).

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mayor actividad en los pacientes jóvenes no fue exclusiva del DAS28, sino que todos los componentes de este índice mostraron esta relación. Los cuatro componentes del DAS28 fueron más altos en los pacientes anti-CarP positivos, y de forma más marcada en los de menor edad (Figura 24, Tabla 23). Además, las asociaciones con los componentes del DAS28 también fueron específicas de los anticuerpos anti-CarP, ya que se mantuvieron significativas tras ajustar por la presencia de los ACPA y el FR (Tabla 23). Una vez confirmada la asociación específica de los anticuerpos anti-CarP con los componentes del DAS28 en los pacientes más jóvenes, se decidió realizar un análisis que permitiese conocer la contribución de cada uno de los componentes sobre esta asociación. El análisis consistió en recalculer el DAS28 de los pacientes con ≤ 30 años excluyendo a cada uno de los componentes por separado. Así, el componente excluido que genere una diferencia

menor entre el DAS28 de los pacientes anti-CarP positivos y negativos, será el componente que más contribuya. El DAS28 recalculado de los pacientes anti-CarP positivos y negativos se redujo especialmente al excluir las articulaciones dolorosas de la fórmula (1.12 vs. 1.63 sin las inflamadas, 1.60 sin la valoración global del paciente y 1.59 sin la VSG). Por lo tanto, el número de articulaciones dolorosas sería el componente del DAS28 que más peso tendría en el incremento de la actividad de los pacientes anti-CarP positivos de menor edad.

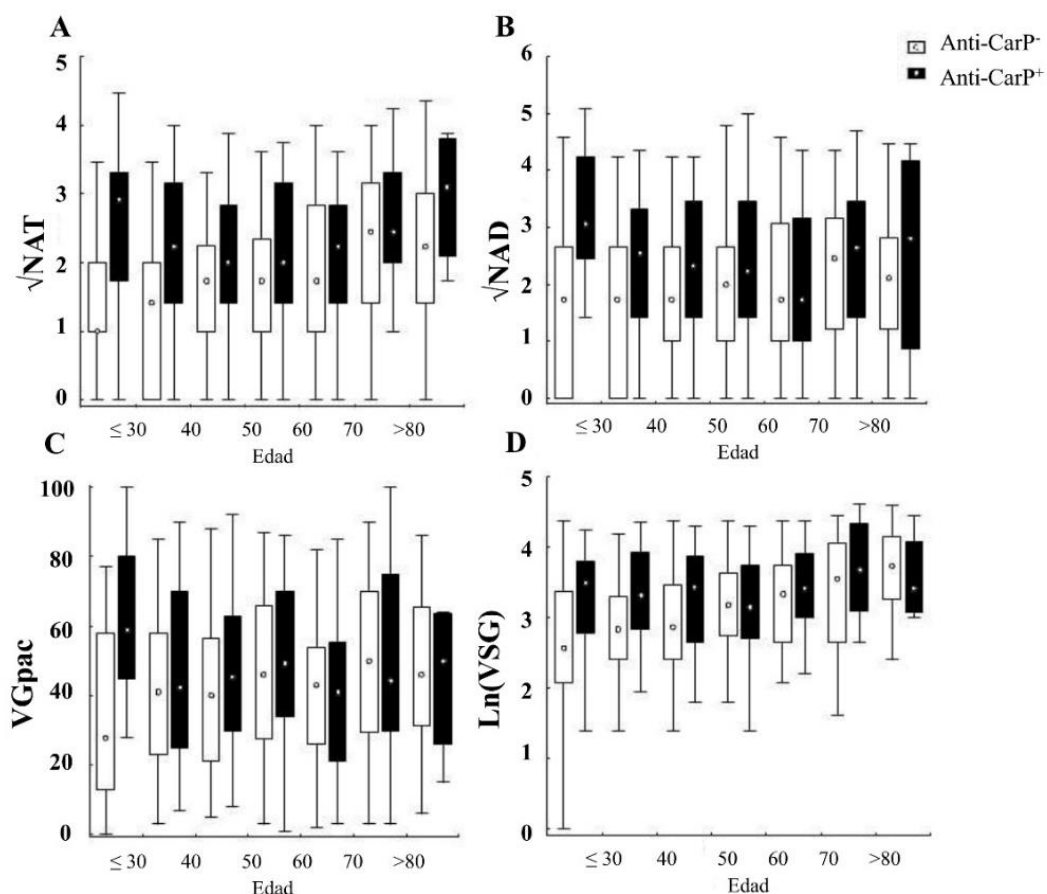


Figura 24. Todos los componentes del DAS28 estuvieron elevados en los pacientes anti-CarP positivos de menor edad. En la gráfica se muestra la mediana (punto vacío), el rango intercuartílico y el intervalo de confianza del 95 % de A. número de articulaciones inflamadas, B. número de articulaciones dolorosas, C. valoración global del paciente y D. VSG en los pacientes anti-CarP positivos (negro) y negativos (blanco). Se aplicó una transformación de los componentes de acuerdo a la fórmula del DAS28: $\sqrt{\text{NAT}}$ = raíz cuadrada del número de articulaciones inflamadas, $\sqrt{\text{NAD}}$ = raíz cuadrada del número de articulaciones dolorosas, VGpac = valoración global del paciente, $\text{Ln}(\text{VSG})$: logaritmo natural de la VSG.

Tabla 23. Análisis de la asociación de los componentes del DAS28 con los anticuerpos y su interacción con la edad. Se muestran los resultados de la regresión lineal con cada uno de los anticuerpos por separado, y de cada uno de los anticuerpos en los de los modelos condicionados por los otros dos autoanticuerpos. Se aplicó una transformación de los componentes de acuerdo a la fórmula del DAS28: $\sqrt{\text{NAT}}$ = raíz cuadrada del número de articulaciones inflamadas, $\sqrt{\text{NAD}}$ = raíz cuadrada del número de articulaciones dolorosas, VGPac = valoración global del paciente, Ln(VSG): logaritmo natural de la VSG.

	Término del anticuerpo			Término de la interacción		
	β	SE	p	β	SE	p
$\sqrt{\text{NAT}}$						
Anti-CarP	0.48	0.11	1.5×10^{-5}	0.36	0.13	0.004
Anti-CarP + ACPA & FR	0.39	0.12	0.001	0.33	0.14	0.018
ACPA + Anti-CarP & FR	0.41	0.15	0.006	0.29	0.16	0.064
FR + ACPA & Anti-CarP	0.13	0.15	0.36	0.16	0.15	0.29
$\sqrt{\text{NAD}}$						
Anti-CarP	0.46	0.11	3.8×10^{-5}	0.37	0.13	0.003
Anti-CarP + ACPA & FR	0.38	0.12	0.0019	0.31	0.14	0.027
ACPA + Anti-CarP & FR	0.11	0.15	0.47	0.1	0.16	0.55
FR + ACPA & Anti-CarP	0.11	0.15	0.45	0.08	0.15	0.61
VGPac						
Anti-CarP	0.4	0.11	0.0004	0.38	0.13	0.003
Anti-CarP + ACPA & FR	0.36	0.12	0.0034	0.35	0.14	0.014
ACPA + Anti-CarP & FR	0.18	0.15	0.22	0.12	0.16	0.45
FR + ACPA & Anti-CarP	0.08	0.15	0.61	0.04	0.16	0.82
Ln(VSG)						
Anti-CarP	0.35	0.11	0.0014	0.27	0.12	0.031
Anti-CarP + ACPA & FR	0.33	0.12	0.006	0.32	0.14	0.019
ACPA + Anti-CarP & FR	0.16	0.15	0.28	0.03	0.16	0.84
FR + ACPA & Anti-CarP	0.07	0.14	0.63	0.11	0.15	0.47

Al principio de este apartado se ha comentado que el DAS28 basal mostraba una correlación significativa con los pacientes anti-CarP⁺. El incremento de la actividad de la enfermedad con la edad de los pacientes anti-CarP⁺ se analizó con algo más de detalle. El análisis realizado en este grupo de pacientes consistió en conocer si alguno de los componentes del DAS28 era el responsable de esta correlación. Para ello, se determinó la correlación entre la edad y cada uno de los componentes del DAS28 en los pacientes anti-CarP⁺. Aunque está descrito que la VSG se incrementa con la edad²⁴¹, este no fue el componente principalmente implicado, sino que los cuatro parámetros mostraron una correlación significativa con la edad de los pacientes anti-CarP⁺ (NAT: r_s : 0.28, $p = 5.4 \times 10^{-14}$, NAD: r_s : 0.12, $p = 0.015$, VSG: r_s : 0.28, $p = 7.4 \times 10^{-14}$ y VGpac: r_s : 0.15, $p = 0.0001$). En consecuencia, todos los componentes del DAS28 se incrementaron significativamente con la

edad de los pacientes anti-CarP⁻, aunque lo hicieron de forma menos marcada el VGpac y el NAD que el NAT y la VSG. En los pacientes anti-CarP⁺ ninguno de los componentes mostró una correlación significativa con la edad.

4.3 Mayor incapacidad funcional en los pacientes anti-CarP positivos de menor edad.

Los pacientes anti-CarP positivos también mostraron una mayor incapacidad funcional. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el HAQ basal de los pacientes anti-CarP positivos fue significativamente mayor que el de los negativos. Además, esta asociación de los anticuerpos anti-CarP con el HAQ al inicio se mantuvo significativa aun teniendo en cuenta a los ACPA o al FR (Tabla 21). Hasta aquí los resultados con el HAQ y el DAS28 fueron bastante similares, y por este motivo se trató de ver si el HAQ de los pacientes anti-CarP positivos también era mayor en los de menor edad. Efectivamente, el HAQ mostró una asociación significativa con la interacción entre los anticuerpos anti-CarP y la edad de los pacientes (Figura 25 y Tabla 24). Así, la mayor incapacidad funcional de los pacientes anti-CarP positivos fue mucho más notable en los pacientes más jóvenes. Los pacientes con ≤ 30 años anti-CarP positivos mostraron una puntuación HAQ 0.66 unidades mayor que los pacientes negativos de la misma edad (1.45 vs. 0.79, $p = 0.0004$). Además, la asociación del HAQ con la interacción entre los anticuerpos anti-CarP y la edad fue independiente del resto de variables de confusión (presencia de erosiones: $\beta = 0.40$, $SE = 0.12$, $p = 0.002$, clasificación inicial de los pacientes: $\beta = 0.25$, $SE = 0.11$, $p = 0.024$ y clasificación al final del seguimiento: $\beta = 0.32$, $SE = 0.11$, $p = 0.005$) y de la presencia de los ACPA y el FR (Tabla 24). Por último, al igual que lo observado con el DAS28, el HAQ de los pacientes anti-CarP negativos se incrementó con la edad ($r = 0.22$, $p = 1.0 \times 10^{-8}$, Figura 25.B), mientras que en los pacientes anti-CarP positivos este índice no mostró la misma tendencia ($r = 0.01$, $p = 0.9$, Figura 25. B).

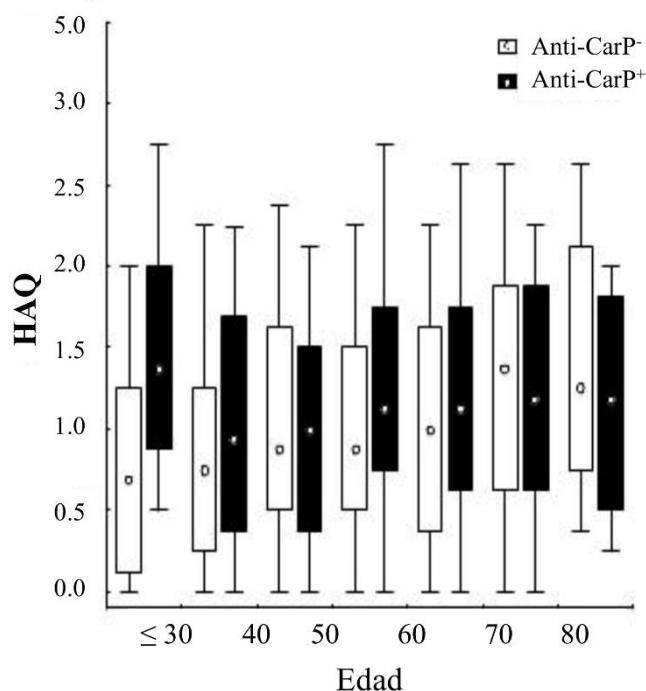


Figura 25. Mayor incapacidad funcional en los pacientes anti-CarP positivos de menor edad. En la gráfica se muestra la mediana (punto vacío), el rango intercuartílico y el intervalo de confianza del 95 % del HAQ en los pacientes anti-CarP positivos (negro) y negativos (blanco).

Tabla 24. Análisis de la asociación entre la incapacidad funcional en los pacientes con EA y la presencia de los anticuerpos y su interacción con la edad. Se muestran los resultados de los modelos de regresión lineal con cada uno de los anticuerpos en los modelos que sólo consideran un anticuerpo por separado y los modelos incluyendo a los tres autoanticuerpos.

	Término del anticuerpo			Término de la interacción		
	β	SE	p	β	SE	p
Anti-CarP	0.38	0.11	8.0×10^{-4}	0.35	0.13	0.007
Anti-CarP + ACPA & FR	0.33	0.12	0.008	0.29	0.14	0.04
ACPA + Anti-CarP & FR	0.27	0.15	0.08	0.22	0.17	0.18
FR+ ACPA & Anti-CarP	0.12	0.15	0.4	-0.07	0.16	0.7

4.4 Los pacientes anti-CarP positivos mostraron una peor evolución de manera independiente a la edad.

Las asociaciones de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad y la incapacidad funcional comentadas anteriormente se refieren siempre a datos basales. Por este motivo se decidió analizar si la relación de los anticuerpos anti-CarP con el DAS28 y el HAQ se mantenía a lo largo de los dos años de seguimiento. Los pacientes anti-CarP positivos mostraron una mayor actividad que los pacientes negativos en las visitas de seguimiento ($p \leq 7.5 \times 10^{-4}$, Figura 26.A). Como resultado de esta asociación, los pacientes anti-CarP positivos alcanzaron con menos frecuencia la remisión de la enfermedad. Así, el 22.8 % de los pacientes anti-CarP positivos con actividad moderada alcanzó la remisión a los 6 meses, frente al 35.2 % de los negativos ($p = 0.004$). En el conjunto de pacientes con actividad alta al inicio pasó algo similar. En este caso el 12.6 % de los pacientes anti-CarP positivos alcanzó la remisión a los 6 meses, frente al 26.6 % de los pacientes anti-CarP negativos ($p = 0.012$). A pesar de la asociación entre los anticuerpos anti-CarP y la actividad de la enfermedad durante el seguimiento, la diferencia entre los pacientes positivos y negativos fue disminuyendo en las visitas posteriores al mismo tiempo que disminuyó el nivel del DAS28: 0.56 unidades a los 6 meses, 0.50 a los 12 meses y 0.48 a los 24. Probablemente, esta pequeña diferencia hizo que no hubiese ninguna interacción significativa entre los anticuerpos anti-CarP y la edad en cada uno los tiempos de seguimiento. En otras palabras, el DAS28 fue similar en los pacientes anti-CarP positivos jóvenes y de mayor edad en las visitas siguientes al inicio del estudio (Figura 27). Además, la correlación entre el DAS28 y la edad de los pacientes anti-CarP⁻ observada al inicio, también se perdió en el seguimiento (r_s : 0.07, $p = 0.33$ a los 6 meses).

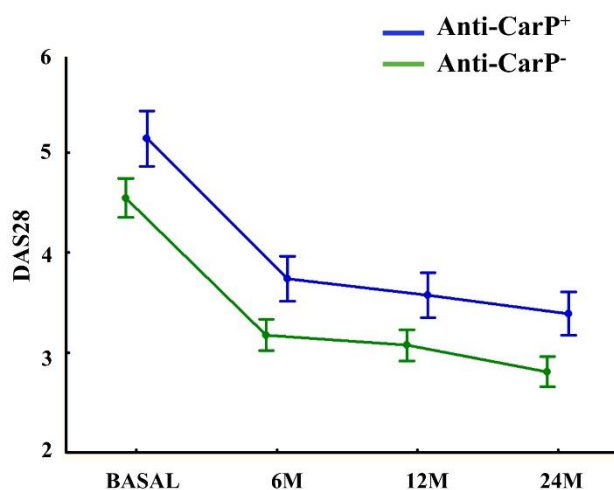


Figura 26. Valores de DAS28 durante el seguimiento en los pacientes anti-CarP positivos y negativos.

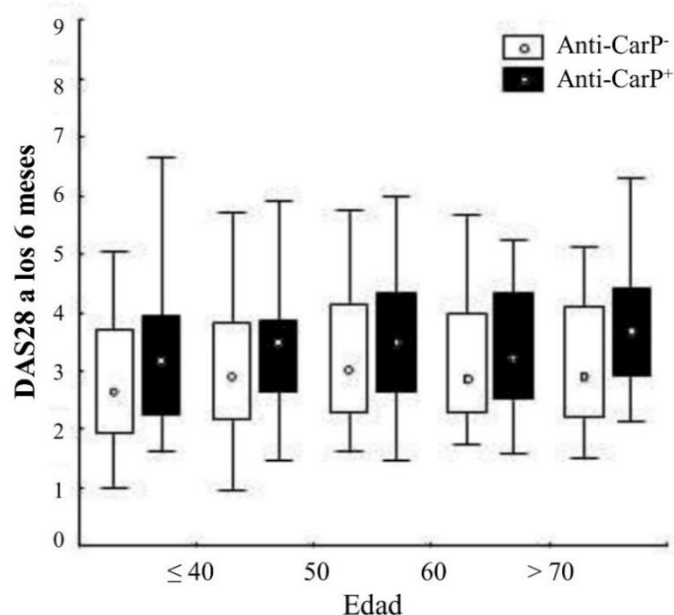


Figura 27. DAS28 elevado a los 6 meses de seguimiento en los pacientes anti-CarP positivos de manera independiente de la edad. En cada gráfica se muestra la mediana (punto vacío), el rango intercuartílico y el intervalo de confianza del 95 % del DAS28 a los 6 meses, en los pacientes anti-CarP positivos (negro) y negativos (blanco).

Del conjunto global de pacientes, 546 presentaron disponible el dato sobre el tratamiento recibido en la consulta inicial. De estos, 453 recibieron algún tipo de tratamiento. Se utilizaron FAMEs (50.1 %), corticoides (10.6 %) o una combinación de los dos (39.3 %) (Figura 28). La mayor parte de los pacientes tratados con FAMEs recibieron MTX (82.2 %), quedando un porcentaje muy bajo de pacientes tratados con sulfasalazina (5.4 %), leflunomida (3.2 %), antipalúdicos (8.1 %) u otros fármacos (1.0 %) (Figura 28). De los pacientes tratados, 161 (35.5 %) mantuvieron el mismo tratamiento durante el seguimiento. La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la peor evolución de los pacientes con EA se mantuvo significativa aun incluyendo al tratamiento en el análisis multivariante (Tabla 25). En estos análisis se tuvo en cuenta el tratamiento con corticoides, con FAMEs y el cambio del tratamiento a los 6 meses. Además, los resultados se mantuvieron significativos tanto considerando a todos los FAMEs en un mismo grupo, como separando al MTX del resto de fármacos ($\beta = 0.10$, $p = 0.01$ al inicio, $\beta = 0.13$, $p = 0.003$ a los 6, $\beta = 0.13$, $p = 0.01$ a los 12 y $\beta = 0.20$, $p = 0.00007$ a los 24 meses). La asociación también persistió al incluir en el modelo la dosis de MTX, tanto definiendo a esta variable cuantitativamente ($\beta = 0.10$, $p = 0.02$ al inicio, $\beta = 0.14$, $p = 0.002$ a los 6, $\beta = 0.13$, $p = 0.01$ a los 12 y $\beta = 0.21$, $p = 0.00005$ a los 24

meses), o cualitativamente en dos grupos ($\beta = 0.11$, $p = 0.01$ al inicio, $\beta = 0.14$, $p = 0.002$ a los 6, $\beta = 0.14$, $p = 0.007$ a los 12 y $\beta = 0.21$, $p = 0.00004$ a los 24 meses). Además, la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la peor evolución de los pacientes con EA fue independiente del resto de variables que pudiesen tener una influencia en el análisis: sexo, edad de inicio de los síntomas, tiempo de evolución y tabaco (Tabla 25).

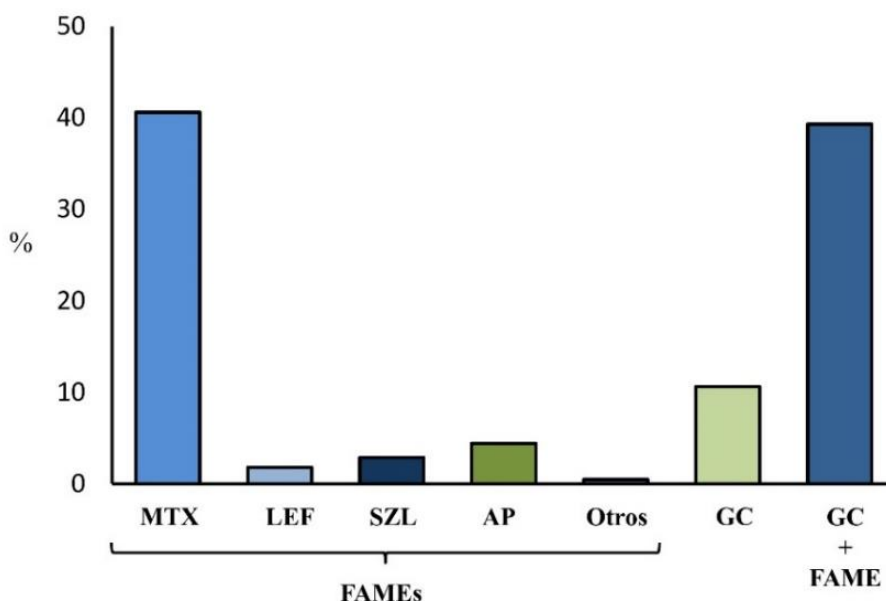


Figura 28. Porcentaje de pacientes tratados con FAMEs, GC o una combinación de ambos. MTX: metotrexato, 82.2 %; SZL: sulfazalazina, 5.4 %; LEF: leflunomida, 3.2 %; AP: antipalúdicos, 8.1 %; Otros: otros FAMEs, 1.0 %; GC: glucocorticoides, 10.6 %; GC + FAME, 39.3 %.

Tabla 25. Asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad al inicio y en las visitas de seguimiento independientemente del tratamiento inicial. Se muestran los resultados de los modelos de regresión lineal ajustados por las variables de confusión y excluyendo o incluyendo al tratamiento inicial.

Visita	Sin ajustar por tratamiento			Ajustado por tratamiento		
	β	SE	p	β	SE	p
Inicio	0.14	0.04	0.001	0.10	0.04	0.01
6 meses	0.15	0.04	0.001	0.14	0.04	0.002
12 meses	0.14	0.05	0.005	0.13	0.05	0.01
24 meses	0.21	0.05	3.0×10^{-5}	0.20	0.05	7.0×10^{-5}

La incapacidad funcional aumentada en los pacientes con anticuerpos anti-CarP no se mantuvo durante el seguimiento. Los valores de HAQ en las visitas de seguimiento mejoraron

mucho en los dos grupos de pacientes, sin que hubiera diferencias entre los pacientes anti-CarP positivos y negativos (Figura 29).

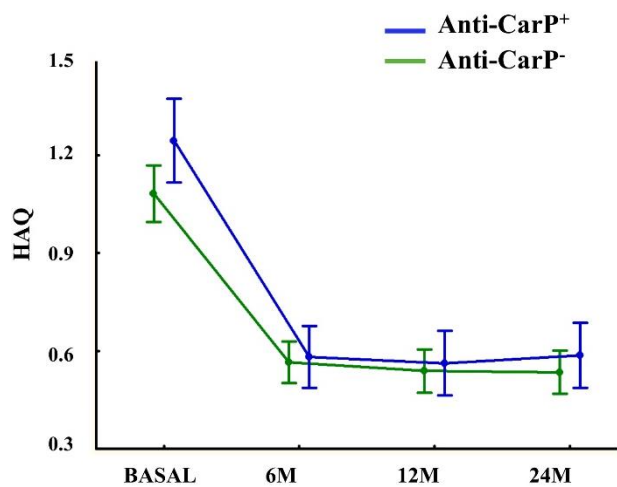


Figura 29. Valores del HAQ durante el seguimiento en los pacientes anti-CarP positivos y negativos.



CAPÍTULO 5.

Asociación de los anticuerpos anti-CarP con
la disminución de la DMO en los pacientes con EA.

Association of High Titers of Anti-Carbamylated Protein Antibodies With Decreased Bone Mineral Density in Early Arthritis Patients.

Cristina Regueiro, Ana M Ortiz, María Dolores Bóveda, Santos Castañeda, Isidoro González-Álvaro, Antonio González.

Regueiro C, Ortiz AM, Boveda MD, et al. PLoSOne. 2018 Aug 17;13(8):e0202583. doi: 10.1371/journal.pone.0202583. Anexo 4.



5.1. Características de los pacientes incluidos.

Los pacientes incluidos en este estudio pertenecían a la cohorte PEARL, y se seleccionaron por presentar exploración de densitometría ósea al inicio del seguimiento. Las características generales de estos pacientes ya han sido presentadas en el estudio sobre el valor de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación de la AR, y están recogidas en la Tabla 14 del capítulo 3. En la figura 30 se representa la distribución de autoanticuerpos en los pacientes incluidos. De los 548 pacientes utilizados, el 26 % fue positivo para los anticuerpos anti-CarP.

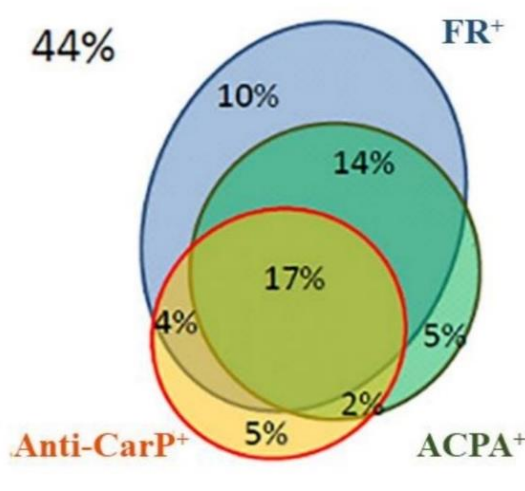


Figura 30. Diagrama de Venn mostrando la positividad y el solapamiento de los tres autoanticuerpos en los pacientes con EA. Los datos completos para los tres anticuerpos estuvieron disponibles en 532 pacientes, de los cuales el 44 % fue negativo para los tres anticuerpos (indicado en la parte superior izquierda del gráfico).

Al margen de las diferencias evidentes en el porcentaje de positividad para el FR y los ACPA, no hubo importantes discrepancias entre las características clínicas de los pacientes negativos y positivos para los anticuerpos anti-CarP (Tabla 26). Únicamente se puede mencionar que los pacientes positivos presentaron una mayor puntuación HUPI. El HUPI es un índice desarrollado en el Hospital Universitario de La Princesa para valorar la actividad de la enfermedad de manera similar al DAS28. En este trabajo los pacientes también se estratificaron según los títulos de los anticuerpos anti-CarP. La comparación entre los pacientes con títulos bajos y altos mostró que estos últimos presentaban un tiempo de evolución menor, y una mayor actividad e incapacidad funcional de la enfermedad (Tabla 26).

Tabla 26. Características de los pacientes con EA incluidos en este análisis. En la tabla se muestran las características clínicas y serológicas de los pacientes estratificados en función de los títulos de anti-CarP. Los P_1 valores son el resultado de la comparación de los pacientes positivos y negativos. Los P_2 valores son el resultado de la comparación de los pacientes positivos con títulos altos y los pacientes positivos con títulos bajos.

Características	Anti-CarP ⁻ (n=406)	Anti-CarP ⁺ bajos (n=68)	Anti-CarP ⁺ altos (n=74)	P_1	P_2
Mujeres (%)	328 (80.8)	53 (77.94)	62 (83.78)	0.96	0.4
Edad de inicio de los síntomas, mediana (IQR)	55 (42-68)	55 (46-63)	54 (44-65)	0.6	0.7
Fumadores (%)	178 (45.4)	31 (47.7)	38 (52.8)	0.4	0.6
IMC, mediana (IQR)	26 (23-29)	26 (24-29)	26 (23-29)	0.9	0.7
Menopausia (%)	141 (34.5)	27 (39.7)	30 (40.5)	0.5	0.3
Semanas de evolución, mediana (IQR)	20 (10-33)	25 (15-36)	17 (11-28)	0.8	0.011
FR positivos (%)	133 (32.8)	51 (75.0)	53 (71.6)	<0.001	0.7
ACPA positivos (%)	101 (25.8)	45 (66.2)	53 (73.6)	<0.001	0.3
DAS28, mediana (IQR)	4.0 (3.1-5.1)	3.9 (2.9-5.2)	4.8 (3.5-5.9)	0.045	0.011
HUPI, mediana (IQR)	6.0 (4.0-9.0)	6.5 (4.0-9.0)	8.0 (6.0-10.0)	0.016	0.046
HAQ, mediana (IQR)	0.9 (0.4-1.5)	0.8 (0.3-1.4)	1.0 (0.6-1.6)	0.8	0.022

5.2. Los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de la DMO.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida ósea generalizada se analizó considerando a la DMO en términos absolutos y como puntuaciones Z. Aunque es importante recordar que las puntuaciones Z únicamente estuvieron disponibles para la cadera total (CaT) y la columna lumbar (CoL). En primer lugar, la relación de los anticuerpos anti-CarP con la DMO se exploró teniendo en cuenta la presencia o ausencia de estos anticuerpos. Los pacientes anti-CarP positivos presentaron una disminución significativa de la DMO en la CaT ($\beta = -0.03$, $p = 0.02$), si bien es cierto que esta asociación únicamente fue significativa al considerar a la DMO en términos absolutos (Tabla 27). En la CoL y en las articulaciones metacarpofalángicas (MCF), la DMO no fue significativamente distinta entre los pacientes positivos y negativos, tanto utilizando valores absolutos como puntuaciones Z (Tabla 27).

Tabla 27. Análisis de la asociación de la DMO con la presencia o ausencia de los anticuerpos anti-CarP. En la tabla se muestra la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la DMO en la CoL, la CaT y en las articulaciones MCF. El análisis se realizó considerando a la DMO en términos absolutos o utilizando puntuaciones Z en aquellas localizaciones en las que estas estuvieron disponibles.

Localización	DMO	β^1	DS	P
CoL	mg/cm ²	-0.02	0.01	0.16
	puntuación Z	-0.18	0.12	0.14
CaT	mg/cm ²	-0.03	0.01	0.02
	puntuación Z	-0.15	0.10	0.12
MCF	mg/cm ²	0.00	0.01	0.59

¹Coefficiente de la regresión lineal multivariante ajustada por sexo, IMC, edad de inicio de los síntomas y menopausia.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la DMO también se analizó considerando el nivel de los títulos de los pacientes positivos (positivo-alto o positivo-bajo). Los pacientes con títulos altos mostraron una disminución de la DMO tanto en la CoL como en la CaT. Además, la fuerza de esta asociación fue mayor al considerar a la DMO como puntuaciones Z. Por el contrario, en las articulaciones MCF, la DMO no mostró diferencias entre los pacientes positivos con títulos altos y los pacientes con títulos más bajos (Tabla 28).

Tabla 28. Asociación de la DMO con los anticuerpos anti-CarP estratificados como negativos, positivos-bajos o positivos-altos. En la tabla se muestra la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la DMO en la CoL, la CaT y en las articulaciones MCF. El análisis se realizó considerando a la DMO en términos absolutos o utilizando puntuaciones Z en aquellas localizaciones en las que estas estuvieron disponibles.

LOCALIZACIÓN	DMO	Anti-CarP	β^1	DS	P
CoL	mg/cm ²	negativo ²	ref.	-	-
		positivo-bajo	0.01	0.02	0.7
		positivo-alto	-0.04	0.02	0.03
	Puntuación Z	negativo	ref.	-	-
		positivo-bajo	0.05	0.16	0.8
		positivo-alto	-0.39	0.16	0.01
CaT	mg/cm ²	negativo ³	ref.	-	-
		positivo-bajo	-0.03	0.02	0.10
		positivo-alto	-0.03	0.02	0.08
	Puntuación Z	negativo ³	ref.	-	-
		positivo-bajo	0.00	0.13	1.0
		positivo-alto	-0.30	0.13	0.02
MCF	mg/cm ²	negativo	ref.	-	-
		positivo-bajo	0.01	0.01	0.4
		positivo-alto	0.00	0.01	0.4

¹Coefficiente de la regresión lineal multivariante ajustada por sexo, IMC, edad de inicio de los síntomas, y menopausia. ²Regresión lineal multivariante ajustada como en β^1 pero incluyendo también la variable etnia como covariable. ³Regresión lineal multivariante ajustada como en β^1 pero incluyendo también la actividad de la enfermedad como covariable.

5.3. Asociación de la pérdida de DMO con los anticuerpos anti-CarP con independencia de los ACPA.

La asociación de la pérdida de la DMO con los ACPA demostrada anteriormente en estos pacientes¹⁶¹ junto con la elevada concordancia entre los autoanticuerpos (Figura 28), hacen que sea posible que los resultados mostrados en el apartado anterior sean consecuencia de la presencia de los ACPA y no específicos de los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP. Por este motivo, para conocer la aportación de los anticuerpos anti-CarP en la pérdida ósea, se analizó la asociación de la DMO con los anticuerpos anti-CarP en los pacientes ACPA negativos y ACPA positivos por separado (Tabla 29). La disminución de la DMO expresada como puntuaciones Z solo fue significativa en los pacientes ACPA positivos / anti-CarP

positivos-altos, tanto en la CoL ($\beta = -0.50$ $p = 0.007$) como en la CaT ($\beta = -0.37$ $p = 0.005$). Asimismo, la disminución de la DMO mostró coeficientes de la regresión similares en los pacientes ACPA negativos con títulos altos para los anticuerpos anti-CarP y los ACPA positivos / anti-CarP positivos-altos ($\beta = -0.50$ vs. -0.52 en CoL, y $\beta = -0.37$ vs. -0.30 en CaT) aunque estas asociaciones no fueron significativas. Con estos resultados lo más probable es que la asociación de los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP con la baja DMO sea independiente de la presencia de los ACPA. La falta de asociación significativa en los pacientes ACPA negativos /anti-CarP positivos-altos con la baja DMO probablemente sea consecuencia del pequeño tamaño de este grupo de pacientes (Tabla 29).

Tabla 29. Asociación de la DMO con los anticuerpos anti-CarP estratificados en función de sus títulos en los pacientes ACPA negativos y ACPA positivos. El análisis se realizó utilizando las puntuaciones Z de la DMO en la CoL y en la CaT, y utilizando siempre como referencia a los pacientes ACPA negativos / anti-CarP negativos. En el análisis se incluyeron los dos autoanticuerpos: los ACPA como positivo o negativo, y los anticuerpos anti-CarP divididos en función del nivel de sus títulos.

LOCALIZACIÓN	ACPA	Anti-CarP (n) ¹	β^2	DS	P
CoL	negativo	negativo (291)	ref.	-	-
		positivo-bajo (23)	-0.17	0.27	0.5
		positivo-alto (19)	-0.52	0.3	0.09
	positivo	negativo (101)	-0.25	0.14	0.09
		positivo-bajo (45)	0.06	0.2	0.8
		positivo-alto (53)	-0.50	0.19	0.007
CaT	negativo	negativo	ref.	-	-
		positivo-bajo	-0.27	0.19	0.16
		positivo-alto	-0.30	0.22	0.17
	positivo	negativo	-0.1	0.1	0.3
		positivo-bajo	0.1	0.14	0.5
		positivo-alto	-0.37	0.13	0.005

¹Número de pacientes en cada grupo. Este número es el mismo para CoL y CaT. ²Regresión lineal multivariante ajustada por sexo, IMC, edad de inicio de los síntomas y menopausia en CoL. En CaT además de las variables anteriores, también se incluyó la actividad de la enfermedad como covariable.





DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos completan todos los objetivos propuestos en este proyecto y serán discutidos a continuación. En primer lugar, se ha conseguido avanzar en la identificación de los factores etiológicos relacionados con los anticuerpos anti-CarP. Por un lado, se ha encontrado una asociación específica entre los anticuerpos anti-CarP y el alelo *DRB1*03*. La solidez de esta asociación permite relacionar por primera vez a los anticuerpos anti-CarP con el complejo HLA y ayuda a definir los factores genéticos que predisponen al desarrollo de estos anticuerpos. Por otro lado, el trabajo sobre la relación del tabaquismo con los autoanticuerpos de la AR también contribuye a definir los mecanismos patogénicos que predisponen a la producción de los anticuerpos anti-CarP. A pesar de la falta de asociación específica entre los anticuerpos anti-CarP y el tabaquismo, este factor ambiental se relacionó con la presencia concordante de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP. Una asociación que identifica a la triple positividad como una categoría de pacientes con un componente etiológico diferenciado y que requiere la búsqueda de mecanismos que expliquen cómo el tabaquismo contribuye a la presencia de múltiples autoanticuerpos. Además, las relaciones encontradas entre el tabaquismo, la triple positividad y el FR cuestionan el modelo patogénico que atribuye la asociación del tabaco exclusivamente a los ACPA. En segundo lugar, los resultados de este proyecto han caracterizado algunas de las implicaciones clínicas que podrían tener los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores en los pacientes con AR. Así, se ha mostrado que la mejoría en sensibilidad obtenida con la consideración de la presencia de los anticuerpos anti-CarP en pacientes con EA es insuficiente para contrarrestar la pérdida en especificidad a la hora de establecer la clasificación como AR o no AR. Sin embargo, su presencia concordante con la de los ACPA y el FR sí contribuye a mejorar la clasificación. Estos resultados destacan la importancia de la triple positividad en la AR y sugieren que la concordancia entre anticuerpos podría considerarse para mejorar los criterios de clasificación actuales. Además del valor de los anticuerpos anti-CarP en la clasificación, en este proyecto se ha estudiado la relación de estos anticuerpos con la actividad y la incapacidad funcional de los pacientes con EA. La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mayor actividad e incapacidad funcional de los pacientes muestra su posible utilidad como biomarcadores pronósticos de la AR. Además, la fuerza de estas asociaciones fue mayor en los pacientes

anti-CarP positivos de menor edad, y por lo tanto la utilidad de los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores de mal pronóstico permitiría mejorar el control de la AR especialmente en los pacientes más jóvenes. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las relaciones con la edad descubiertas necesitan confirmarse y explorarse en busca de un mecanismo, pues son hallazgos fortuitos y totalmente inexplicados. Por último, los resultados de este proyecto indican que los anticuerpos anti-CarP también podrían utilizarse como biomarcadores de pérdida de masa ósea. Hasta el momento los anticuerpos anti-CarP se habían asociado con las erosiones, pero no se habían estudiado en relación con la pérdida de masa ósea generalizada. Los resultados encontrados amplían la relación de los anticuerpos anti-CarP con las alteraciones óseas típicas de los pacientes, y establecen una nueva evidencia sobre el papel patogénico que pueden tener estos anticuerpos en la AR.



1. ASOCIACIÓN ESPECÍFICA DEL *HLA-DRB1*03* CON LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-CARP EN PACIENTES CON AR.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con el alelo *HLA-DRB1*03* presenta una relevancia importante, ya que permite establecer una relación entre estos anticuerpos y el HLA. Hay tres aspectos de esta asociación que requieren comentario. En primer lugar, la asociación del alelo **03* en el grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺ se observó tanto respecto a los pacientes dobles negativos como en comparación con los controles sanos. En segundo lugar, la asociación fue consistente en todas las cohortes incluidas en el meta-análisis, y en último lugar, la asociación fue independiente de otras variables de confusión y no se vio afectada por el efecto del EC en la AR seropositiva.

La asociación del alelo *DRB1*03* con los anticuerpos anti-CarP ya había sido sugerida por *Jiang X y col.*⁷³. Estos autores encontraron que la frecuencia del alelo **03* era mayor en los pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺ que en los sujetos sin la enfermedad. Sin embargo, esta frecuencia no fue mayor respecto al grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁻. Así, al ser indistinguible en los ACPA⁻/anti-CarP⁺ y los dobles negativos, no fue posible atribuir la asociación del alelo **03* al grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺. Afortunadamente, con el análisis realizado en este proyecto se ha conseguido resolver esta duda y demostrar la **03*. A diferencia del estudio de *Jiang X y col.*, en el que se incluyeron las de EIRA y Leiden, en este proyecto se han utilizado un total de 6 cohortes de pacientes con AR. Con la combinación de todas ellas se ha alcanzado la potencia estadística necesaria para encontrar una asociación significativa entre los pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺ y el alelo **03*, tomando como referencia tanto a los dobles negativos como a los sujetos sin la enfermedad.

En cuanto a la consistencia de la asociación, todas las cohortes analizadas mostraron una mayor frecuencia del alelo *HLA-DRB1*03* en los pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺. Esta similitud de efectos se reflejó en la ausencia de heterogeneidad significativa en el meta-análisis, con un coeficiente de inconsistencia igual a cero. Por otra parte, la asociación del alelo **03* con los pacientes ACPA⁻ / anti-CarP⁺ de forma independiente a la presencia del EC es muy importante para interpretar el resultado, ya que el fuerte sesgo introducido por los alelos del EC hace que sea difícil distinguir la contribución independiente del resto de alelos²⁴². En relación con la consistencia de los resultados, también es llamativa la independencia de la

asociación respecto al resto de variables de confusión: el sexo, la edad de inicio de los síntomas y el tiempo de evolución de la enfermedad.

La solidez que estos resultados dan a la asociación del *03 con el grupo de pacientes ACPA⁻/anti-CarP⁺ permite plantear una hipótesis en la que los péptidos carbamilados serían presentados a los linfocitos T autoreactivos en la molécula DRB1*03. Si es cierto que esta idea está claramente limitada por el desconocimiento sobre los antígenos endógenos reconocidos por los anticuerpos anti-CarP. La identificación de estos autoantígenos permitiría verificar su presentación a nivel del *03, realizar estudios de interacción para conocer como tiene lugar la unión entre ellos, y determinar si esta unión es necesaria para desencadenar la respuesta autoinmune. Aun así, los resultados de ese trabajo justifican el planteamiento de la hipótesis sobre la presentación de los antígenos carbamilados. Dado que la fagocitosis es uno de los mecanismos utilizados por las APC para presentar antígenos extracelulares²⁴³, se podría hipotetizar que los antígenos carbamilados serían endocitados y fagocitados por las APC, para posteriormente mostrar los péptidos carbamilados a nivel del *03 e iniciar la respuesta autoinmune (Figura 31).

La molécula HLA-DRB1 presenta una distribución heterogénea entre las distintas etnias. Por este motivo es importante realizar estudios en cohortes de pacientes no europeos que analicen si la asociación entre el HLA-DRB1*03 y los anticuerpos anti-CarP se mantiene en otros grupos étnicos. También resultaría interesante realizar un mapeo genético más fino del HLA que permitiese relacionar a los anticuerpos anti-CarP con las secuencias aminoacídicas. Con estos estudios se podría saber si los anticuerpos anti-CarP se relacionan con aminoácidos concretos en alguna de las cuatro posiciones más asociadas con la AR (posiciones 11, 13, 71 y 74 del DRB1). Además, dado que distintos alelos se corresponden con el mismo aminoácido⁸¹, este tipo de estudios permitirían relacionar a los anticuerpos anti-CarP con más alelos de la molécula HLA-DRB1, no solo con el *03. También, la realización de un estudio más extenso del HLA ayudaría a conocer la relación de estos anticuerpos con otras moléculas HLA, no solo con el DRB1.

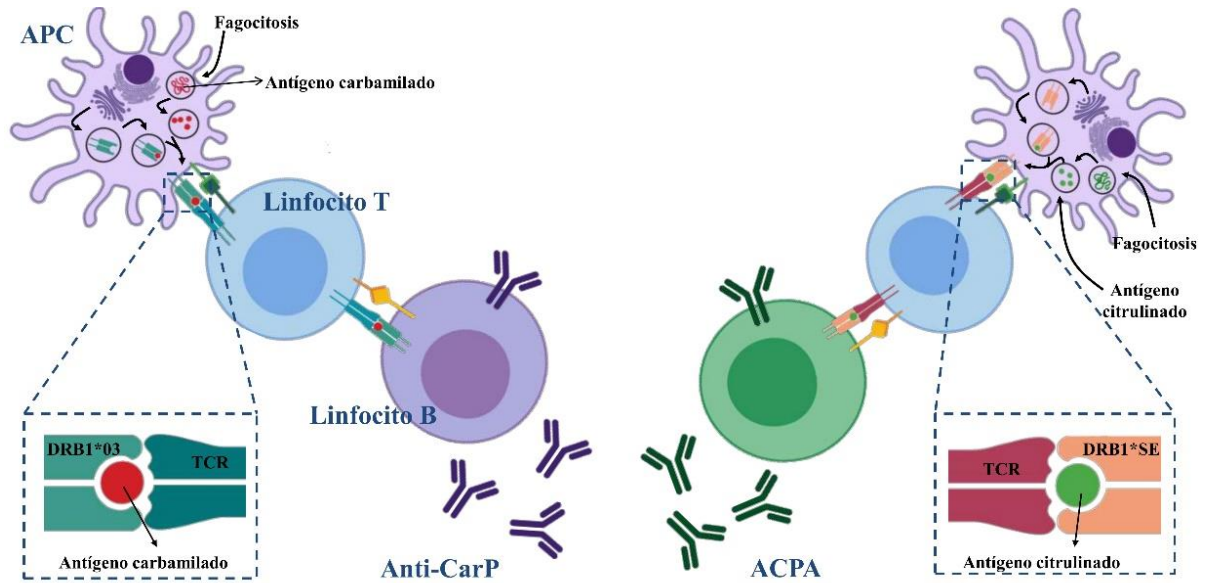


Figura 31. Hipótesis acerca de la presentación de los antígenos carbamilados y citrulinados. Los antígenos carbamilados serían procesados por las APC mediante fagocitosis. Paralelamente, la molécula DRB1*03 sería transportada desde el retículo endoplasmático hasta los endosomas en los que se encuentre el antígeno carbamilado procesado. La molécula DRB1*03 unida al antígeno sería transportada hasta la membrana para llevar a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T autoreactivos. Por último, la presentación de este antígeno a los linfocitos B desencadenaría la producción de los anticuerpos anti-CarP. De manera similar se llevaría a cabo la producción de los ACPA, pero presentando al antígeno citrulinado a través de las moléculas del HLA codificadas por el EC (DRB1*EC). TCR: receptor de linfocitos T. Imagen de autoría propia.

La asociación del alelo *DRB1*03* con los pacientes $ACPA^-/anti-CarP^+$ no solo identifica un factor etiológico a los anticuerpos anti-CarP, sino que también permite explicar parte de la etiología de la AR seronegativa. Los resultados de esta parte del proyecto presentan al *03 como un alelo de riesgo para el desarrollo de la AR y así, el alelo *03 podría sumarse al conjunto de alelos de la molécula HLA-DRB1 que explican la heredabilidad de la AR, disminuyendo la fracción de la heredabilidad todavía desconocida. Por último, otro aspecto importante de los resultados de este trabajo es que corroboran la independencia de los anticuerpos anti-CarP respecto a los ACPA. La falta de asociación de los anticuerpos anti-CarP con el EC observada en este y otros estudios^{26,39,73}, permite justificar la independencia entre ambos autoanticuerpos. La asociación del *03 con los pacientes $ACPA^-/anti-CarP^+$, refuerza la definición de los anticuerpos anti-CarP como un sistema de autoanticuerpos independiente. De esta forma, los ACPA y los anticuerpos anti-CarP serían autoanticuerpos con una etiología diferenciable. Según esto, los antígenos citrulinados serían presentados a

nivel del EC y los antígenos carbamilados a nivel del DRB1*03 (Figura 31). Sin embargo, como se ha comentado en párrafos anteriores, la confirmación de esta idea queda a la espera de la identificación de los antígenos carbamilados reconocidos por los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con AR.



2. EL TABAQUISMO SE ASOCIA PREDOMINANTEMENTE CON LA AR QUE PRESENTA DE FORMA CONCORDANTE VARIOS AUTOANTICUERPOS: CONTROVERSA CON LOS MODELOS PATOGENICOS ACTUALES.

La relación encontrada entre el tabaquismo y la presencia concordante de varios autoanticuerpos en los pacientes con AR, es incongruente con el modelo patogénico establecido hasta el momento. Este modelo atribuye la asociación del tabaquismo con la AR específicamente a los ACPA, como consecuencia de la inducción de la citrulinación por el tabaco a nivel de los pulmones¹⁰⁷. Los resultados encontrados muestran una asociación dominante del tabaquismo con la presencia de los tres autoanticuerpos, además de una asociación exclusiva con el FR en el resto de pacientes. Además de mostrar incoherencia con la idea del modelo patogénico establecido, estos resultados confirman la falta de asociación específica de los anticuerpos anti-CarP con el hábito fumador, algo que ya ha sido publicado previamente por otros autores^{26,73}. Asimismo, los resultados excluyen una asociación aditiva con el número de autoanticuerpos ya que la asociación con el FR fue la misma en los pacientes con uno o dos anticuerpos, y los pacientes positivos para los tres autoanticuerpos mostraron una asociación significativamente mayor que aquellos positivos para uno o dos. En consecuencia, los hallazgos de esta parte del proyecto requieren un nuevo modelo patogénico que incorpore la asociación dominante con múltiples autoanticuerpos y la especificidad por el FR.

La asociación del tabaquismo con la presencia concordante de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP encontrada en las nuevas colecciones de muestras incluidas en este estudio replica el hallazgo del trabajo publicado por *van Wesemael y col.*⁵⁵. Esta replicación permite dar solidez a los resultados y confirmar la relación entre el tabaquismo y la presencia concordante de autoanticuerpos. Además, nuestro trabajo ha sido esencial para comprender mejor esta relación. En el trabajo de *van Wesemael y col.* quedaba la duda de si la asociación con el tabaco se incrementaba de forma gradual con el número de anticuerpos⁵⁵. Ahora, los datos indican que la asociación entre el tabaco y la concordancia de anticuerpos no muestra un efecto aditivo. Algo que se ha conseguido gracias a la combinación de las colecciones utilizadas en *van Wesemael y col.* y las colecciones incluidas en nuestro proyecto.

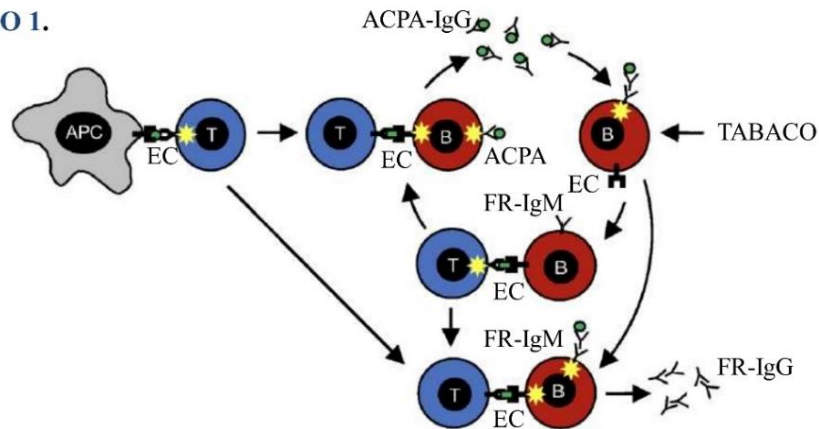
Al margen del trabajo de *van Wesemael y col.*, no hay más estudios que hayan analizado la asociación del tabaco con el número de autoanticuerpos y las distintas combinaciones de los

ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP. Sin embargo, la presencia de los ACPA y el FR en relación con el tabaquismo si se ha estudiado en 4 cohortes independientes. Una de ellas, incluida en el estudio de *van Wesemael y col.*, comprende un total de 9500 sujetos sin AR procedentes de Japón⁵⁵. Las otras 3 cohortes incluyen a pacientes con AR procedentes del Reino Unido (n = 2000)⁹⁹, Estados Unidos (n = 1500)²⁴⁴ y Suecia (n = 3600)¹¹⁴, respectivamente. En las tres primeras cohortes se observó como el tabaquismo se asociaba con la presencia concordante de los dos autoanticuerpos, sin mostrar ningún tipo de relación con la presencia aislada de cada uno de ellos. En la cuarta cohorte, la asociación con el tabaquismo fue más fuerte en los pacientes positivos para los ACPA y el FR^{55,99,244}; y en el resto de pacientes positivos para uno de los dos la asociación fue significativamente mayor en los positivos para el FR¹¹⁴. Todos estos hallazgos son compatibles con los resultados encontrados en este proyecto, y resaltan el papel de la concordancia y del FR en los pacientes fumadores. Además, un último dato interesante, es que no se ha tenido en cuenta la presencia de varios autoanticuerpos en ninguno de los trabajos que respaldan el modelo patogénico que vincula el tabaquismo a los ACPA^{107,245-247}.

El mecanismo responsable de la asociación del tabaquismo con la presencia concordante de anticuerpos no se conoce. Aun así, se podría formular una hipótesis en la que el tabaco llevase a esta situación mediante la propagación de epítomos. La propagación o expansión de epítomos es un mecanismo propio de las respuestas inmunes que también está presente en las enfermedades autoinmunes^{248,249}. Así, años antes del desarrollo de la AR los pacientes que tienen autoreactividad a menudo reconocen un solo epítopo, mientras que justo antes del inicio es más frecuente que estos presenten autoanticuerpos frente a múltiples epítomos¹³⁶⁻¹³⁸. Además de la expansión de epítomos, se han propuesto dos posibles modelos que podrían explicar de forma específica la presencia concordante de ACPA y FR en los pacientes con AR fumadores (Figura 32). Estos dos modelos que se comentarán a continuación se han planteado únicamente como posibles hipótesis, por lo que todavía necesitan ser comprobados. En un primer modelo o modelo convergente, el tabaco estimularía a los linfocitos B productores del FR. Posteriormente, estos linfocitos B reconocerían a los inmunocomplejos formados por los ACPA y las proteínas citrulinadas, y al captar esos inmunocomplejos podrían presentar los antígenos citrulinados a los linfocitos T autoreactivos. A su vez, estos linfocitos T podrían estimular a los linfocitos B productores de FR, con la consecuente producción simultánea de

ambos autoanticuerpos⁴⁷ (Figura 32. A). En un segundo modelo o modelo del antígeno común, el tabaquismo estimularía a los linfocitos B productores del FR. Entre las IgG unidas por el FR estarían moléculas de IgG citrulinadas que podrían ser presentadas a los linfocitos T autoreactivos. Estos linfocitos T activados estimularían a los linfocitos B con capacidad para producir anticuerpos frente a la IgG. En consecuencia, se producirían ACPA que reconocerían los residuos de citrulina de la IgG y FR que reconocerían su porción Fc. Así, la IgG citrulinada sería un antígeno común para el FR y los ACPA, capaz de explicar la producción simultánea de los dos anticuerpos en los pacientes fumadores⁴⁷ (Figura 32. B). En estos modelos no se ha tenido en cuenta a los anticuerpos anti-CarP. Sin embargo, se podrían plantear hipótesis que los incorporasen de forma similar invocando la presencia de inmunocomplejos con proteínas carbamiladas en el primer modelo, y postulando la presencia de IgG carbamilada y citrulinada en el modelo del antígeno común.

A) MODELO 1.



B) MODELO 2.

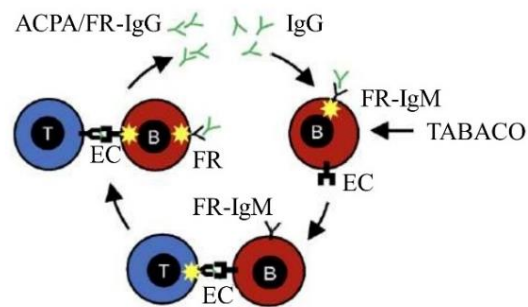


Figura 32. Posibles modelos para explicar la presencia concordante de autoanticuerpos en los pacientes con AR fumadores. A) Modelo 1 o de rutas convergentes. En verde aparecen representados los péptidos citrulinados. B) Modelo 2 o del antígeno común. En verde aparece representada la IgG citrulinada. Imagen tomada y modificada del trabajo de *Shelef MA y col.*⁴⁷, con permiso de John Wiley & Sons.

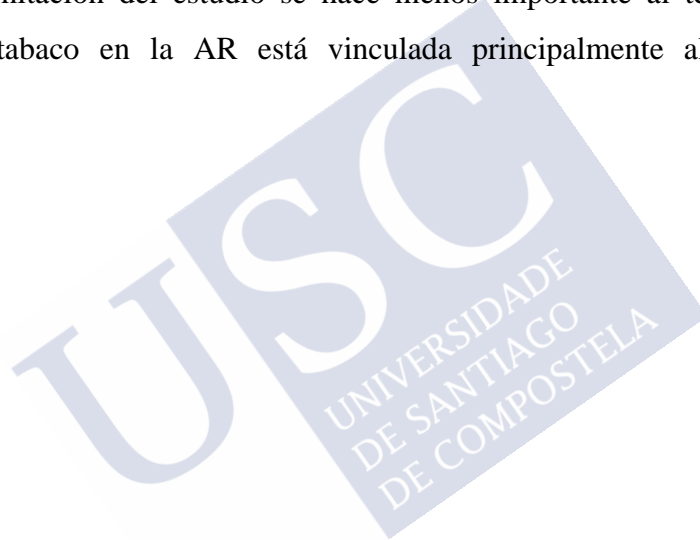
Sin embargo, no es necesario pensar en mecanismos de producción concordante de los anticuerpos que dependan de la presencia concordante de los antígenos como los dos mencionados. Basta considerar la capacidad del humo del tabaco para fomentar la autoinmunidad y la producción de autoanticuerpos. En efecto, el tabaco es un factor capaz de generar inflamación y daño tisular, así como de reclutar y activar a células inmunes como neutrófilos, monocitos y macrófagos. Además, el tabaco puede afectar a la función y desarrollo de células dendríticas, células *natural killer*, linfocitos B y distintos subtipos de linfocitos T^{250,251}. Todos estos efectos del tabaquismo predisponen a la autoinmunidad, con la consecuente generación de autoanticuerpos^{250,251}. Como ejemplo, el tabaco se ha asociado con la producción de anticuerpos anti-ADN de doble cadena en el LES²⁵², con los anticuerpos anti-Jo1 en las miopías inflamatorias²⁵³, y con el FR y otros autoanticuerpos en fumadores sin ninguna enfermedad autoinmune^{55,254,255}.

La relación entre el tabaquismo y el FR en los pacientes que no eran triple positivos, sugiere que este autoanticuerpo podría preceder al resto de los autoanticuerpos en los fumadores. Sin embargo, el carácter transversal de las colecciones de muestras utilizadas en este trabajo impide examinar esta idea. Además, no se conoce cuál es el orden de aparición de los distintos autoanticuerpos, ya que los estudios realizados en fases iniciales de la AR han mostrado resultados bastante discordantes. El FR fue el primero en aparecer en los pacientes con AR procedentes de una cohorte sueca²⁵⁶, mientras que los ACPA¹³⁷ y los anticuerpos anti-CarP¹⁴⁰ precedieron a este en una cohorte de pacientes holandeses. Por lo tanto, todavía se necesitan más estudios longitudinales que permitan conocer con seguridad el orden de aparición de los autoanticuerpos, y si realmente es el FR el primer anticuerpo en los pacientes fumadores. De todos modos, independientemente del orden de aparición, tiene que existir algún mecanismo que explique la asociación específica del tabaco con el FR en los pacientes que no son triple positivos.

En el trabajo de *Newkirk MM y col.* se propone un mecanismo para explicar la producción de autoanticuerpos en fumadores sin enfermedades autoinmunes que podría ser utilizado para comprender la asociación del tabaco con el FR²⁵⁵. Según este mecanismo, el tabaco induciría la expresión de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y la producción de autoanticuerpos frente a esta proteína (anti-Hsp70). La formación de inmunocomplejos entre la proteína y los

anticuerpos desencadenaría la producción del FR. Esta producción tendría lugar tras la unión de los inmunocomplejos con el receptor de linfocitos B (BCR) expresado en la superficie de las células B productoras del FR. Este mecanismo ha sido demostrado en ratones, y aunque la reproducibilidad en humanos no está tan clara, podría ser un buen punto de partida para buscar el mecanismo responsable de la asociación específica del tabaco con el FR en los pacientes que no son triple positivos.

Por último, es importante destacar una de las limitaciones del estudio que consiste en la falta de sujetos control. Es posible que la fuerza de las asociaciones fuese mayor utilizando como referencia a controles sanos en lugar de pacientes negativos para los tres anticuerpos. Aun así, esta limitación del estudio se hace menos importante al tener en cuenta que la asociación del tabaco en la AR está vinculada principalmente al grupo de pacientes seropositivos.



3. VALOR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CARP PARA LA CLASIFICACIÓN COMO AR DE LOS PACIENTES CON EA.

El análisis del valor de los anticuerpos anti-CarP para la clasificación de los pacientes con EA ha permitido delimitar su contribución en distintas formas. Mientras que la combinación “anti-CarP o ACPA o FR” no produjo una mejoría significativa en la exactitud de la clasificación, la concordancia de autoanticuerpos sí se ha demostrado capaz de proporcionar un aumento significativo en esta exactitud. Por lo tanto, esta mejoría requiere combinar la concordancia con los criterios serológicos de la clasificación ACR/EULAR 2010.

Los resultados previos que hemos confirmado muestran que los anticuerpos anti-CarP están asociados con la AR, aunque la fuerza de esta asociación es modesta al compararla con la del FR o los ACPA. En nuestros pacientes, los valores de especificidad de los anticuerpos anti-CarP fueron altos, similares a los del FR y los ACPA. Sin embargo, los anticuerpos anti-CarP mostraron una sensibilidad baja, inferior a la sensibilidad de los ACPA o el FR, y tanto en el conjunto global de pacientes como en el subgrupo de pacientes seronegativos. El resto de parámetros examinados mostraron resultados similares. Así, el VPN de los anticuerpos anti-CarP fue semejante al VPN de los ACPA o el FR, mientras que el valor del VPP fue modesto e inferior al de los otros anticuerpos. Estos resultados indican que la capacidad de los anticuerpos anti-CarP para clasificar a los pacientes con AR es inferior a la de los ACPA o el FR. Además, la similitud entre los parámetros de valor diagnóstico en nuestros pacientes y los obtenidos en una cohorte de EA holandesa¹⁴⁴ refleja la consistencia de este resultado (Tabla 30).

Tabla 30. Parámetros que cuantifican el valor diagnóstico de los anticuerpos anti-CarP, los ACPA y el FR en el estudio actual y en el trabajo de Shi J y col.¹⁴⁴.

		<i>Shi J y col.</i>	Estudio actual
	nº de pacientes	2086	1062
	anti-CarP positivos (%)	26	27
	AR (%)	47	50
anti-CarP	Sensibilidad	44	42
	Especificidad	89	87
	Sensibilidad en los ACPA ⁻	12	18
	Especificidad en los ACPA ⁻	91	88
	VPP	78	76
	VPN	65	61
	RV+	4.2	3.2
	RV-	0.6	0.7
	AUC	0.7	0.6
	ACPA	Sensibilidad	54
Especificidad		96	91
VPP		94	88
VPN		64	73
RV+		12.9	7.5
RV-		0.5	0.4
AUC		0.5	0.8
FR	Sensibilidad	59	68
	Especificidad	91	84
	VPP	86	81
	VPN	72	72
	RV+	6.9	4.2
	RV-	0.4	0.4
	AUC	-	0.8

Al margen de los parámetros comentados, resulta mucho más interesante conocer qué contribución pueden tener los anticuerpos anti-CarP a la clasificación de los pacientes con AR. En los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 los ACPA y el FR se estratifican en función de sus títulos. La estratificación según los títulos no sería necesaria para los anticuerpos anti-CarP, ya que la magnitud de la asociación con la AR fue similar entre los pacientes positivos con títulos altos y los pacientes con títulos bajos. Por otro lado, la inclusión de estos anticuerpos en la combinación utilizada en los criterios, *ACPA o FR*, utilizando el operador “or” (*ACPA o FR o anti-CarP*) produjo un aumento en la sensibilidad

del 2.2 % a costa de una disminución en la especificidad del 8.1 %. Esto significaría que por cada nuevo paciente detectado con AR, 4 pacientes serían clasificados erróneamente como AR. A modo de comparación, este beneficio es inferior al aportado por el FR sobre los ACPA. De acuerdo a los datos de nuestro trabajo, el FR supone un incremento en la sensibilidad del 9.6 %, con una relación beneficio-coste 1:1, en comparación con la ratio 1:4 resultante de la inclusión de los anticuerpos anti-CarP. Con posterioridad a la publicación de nuestro trabajo, *Truchetet ME y col.* mostraron un aumento de la sensibilidad de tan solo el 0.4 % al incorporar los anticuerpos anti-CarP, confirmando la ausencia de beneficio que proporcionan los anticuerpos anti-CarP considerados de esta forma¹⁹².

Los resultados anteriores llevan a reflexionar sobre el beneficio que supondría la inclusión de nuevos autoanticuerpos en los criterios ACR/EULAR 2010. Si los nuevos anticuerpos presentan una gran correlación con el FR o los ACPA, los resultados proporcionarían pequeñas mejoras en la sensibilidad a expensas de un coste importante en la especificidad. Por el contrario, aquellos anticuerpos con una distribución diferente, y especialmente presentes en los pacientes seronegativos, podrían suponer un beneficio mucho más satisfactorio. Esta reflexión también ha sido propuesta por *Boeters DM y col.*, en un trabajo donde advierten en contra de incorporar nuevos autoanticuerpos a los criterios de clasificación²⁰⁹.

Otra consideración importante sobre las características de nuestro trabajo es que los pacientes con EA han sido clasificados con los criterios de la ACR de 1987, mientras que otros estudios previos utilizaron los criterios ACR/EULAR del 2010. El principal motivo que justifica el uso de los criterios de la ACR de 1987 en nuestro estudio es que estos criterios le dan un menor peso a los autoanticuerpos, y la notable aportación del FR y los ACPA en los criterios ACR/EULAR 2010 podría dificultar la estimación de la contribución de los anticuerpos anti-CarP.

La presencia concordante de los ACPA, el FR y los anticuerpos anti-CarP mostró especificidades del 98-100 % en las 12 poblaciones del trabajo de *Verhuel MK y col.*²⁰⁸. La concordancia entre anticuerpos también mostró una especificidad alta para la AR en los pacientes de nuestro estudio (98.7 %), lo que llevó a considerar la posibilidad de utilizar a la triple positividad en la clasificación de los pacientes. Efectivamente, la presencia concordante

de los tres autoanticuerpos se presenta como una herramienta útil para clasificar a los pacientes con AR. El VPP (96.1 %) y la OR (80.9) de los triple positivos fueron lo suficientemente altos como para proponer esta idea. Utilizando este enfoque, 181 pacientes habrían sido clasificados con la enfermedad, 174 de forma correcta y 7 erróneamente. La combinación de los triple positivos con los títulos altos del FR o los ACPA se observó en 178 pacientes, de los cuales 172 se clasificaron como AR y 6 no. Estos resultados indican que la triple positividad podría utilizarse por sí sola para clasificar a los pacientes con AR, sin la necesidad de conocer el nivel de los títulos de los ACPA o el FR. Además, la asociación de la concordancia con la enfermedad fue mayor que la de los títulos altos para el FR o los ACPA, algo que también apoya el valor independiente de la triple positividad en la clasificación de los pacientes. La notable asociación de la concordancia con la AR lleva a pensar que, en caso de incluir a la concordancia entre anticuerpos en los criterios de clasificación, esta tendría que ser puntuada con una calificación más alta que la atribuida a los títulos altos para el FR o los ACPA. También es importante resaltar que 21 pacientes con AR positivos para los tres autoanticuerpos no recibieron tratamiento inicial con FAME (de los 112 con dato de tratamiento). Utilizando la concordancia entre anticuerpos, estos pacientes podrían haber sido controlados de otra forma para aumentar sus posibilidades de éxito a largo plazo. Así, aunque los anticuerpos anti-CarP individualmente no mejoran la clasificación de los pacientes con AR, su presencia concordante con los ACPA y el FR sí se presenta como una herramienta útil a considerar en la clasificación.

4. LOS ANTICUERPOS ANTI-CARP COMO BIOMARCADORES DE MAYOR ACTIVIDAD E INCAPACIDAD FUNCIONAL DE LOS PACIENTES CON EA.

La asociación de los anticuerpos anti-CarP con la mayor actividad e incapacidad funcional de los pacientes con EA, indica la posibilidad de utilizar en la práctica clínica a estos anticuerpos como biomarcadores pronósticos. Algunos de los resultados encontrados en este trabajo no tienen precedente, mientras que otros pueden considerarse repeticiones de otros estudios previos. Las novedades incluyen la asociación de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad e incapacidad funcional de forma mucho más marcada en los pacientes jóvenes que en los de más edad, la asociación de los anticuerpos anti-CarP con los cuatro componentes del DAS28, la demostración de que la tasa de remisión es más baja en los pacientes anti-CarP positivos, y la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la actividad de la enfermedad. Además, se ha replicado el exceso de actividad de la enfermedad en los pacientes anti-CarP positivos^{145,146,192} y la disminución de este exceso a lo largo del seguimiento¹⁴⁵, y la asociación de los anticuerpos anti-CarP con una mayor incapacidad funcional al inicio. En este último caso la asociación no se mantuvo a lo largo del seguimiento en nuestros pacientes, aunque sí lo hizo en el único estudio previo¹⁴⁶. La especificidad de los anticuerpos anti-CarP en estas asociaciones con la actividad y la incapacidad funcional ya había sido planteada por otros autores, aunque gracias a nuestro trabajo el efecto independiente de los anticuerpos anti-CarP se ha podido definir mejor. En los trabajos anteriores o bien el FR no había sido incluido¹⁴⁶, o bien los resultados no estaban claros^{145,192}. En cambio, los anticuerpos anti-CarP se asocian con una mayor actividad de la enfermedad e incapacidad funcional en nuestros pacientes, sin necesitar la presencia de los ACPA o el FR.

Las asociaciones clínicas de los anticuerpos anti-CarP tienen que ser consecuencia de algún tipo de mecanismo patogénico. La asociación de los anticuerpos anti-CarP con el HAQ, el DAS28 y sus distintos componentes indica que estos anticuerpos participan en algún proceso que lleva a incrementar la inflamación articular. Aunque no se conoce el mecanismo patogénico que explica las asociaciones clínicas de los anticuerpos anti-CarP, se podría hipotetizar sobre esta cuestión. Los anticuerpos anti-CarP podrían contribuir a la inflamación mediante la formación de inmunocomplejos capaces de activar el sistema del complemento a través de su unión con receptores Fc²⁵⁷. Además, los anticuerpos anti-CarP podrían actuar directamente sobre algunas células o proteínas que fuesen capaces de modular la inflamación articular. Actualmente la mayoría de las hipótesis sitúan al FR como el principal

autoanticuerpo que contribuye a la inflamación en la AR^{258,259}. Las asociaciones encontradas en este trabajo sugieren que los anticuerpos anti-CarP también podrían ser importantes en este papel. Por lo tanto, se necesitan nuevas investigaciones que traten de aclarar los mecanismos implicados. Un buen punto de partida podría consistir en analizar la relación entre los anticuerpos anti-CarP y los niveles de las citoquinas inflamatorias características de la AR.

La interacción entre la edad de los pacientes y el estatus de los anticuerpos anti-CarP es una de los resultados más notables de esta parte del proyecto. Hay un estudio en el que los pacientes FR positivos de edad avanzada presentaron una enfermedad más severa que los pacientes FR negativos²⁶⁰. Sin embargo, este resultado no se ha replicado en estudios más recientes, ni en nuestros pacientes. En nuestro trabajo esta discriminación aparece claramente entre los pacientes anti-CarP positivos y negativos, sin la contribución del FR. Además, en nuestro caso la diferenciación entre pacientes anti-CarP positivos y negativos fue mayor en los de menor edad. Además de los hallazgos observados en el grupo de pacientes anti-CarP positivos, hay que destacar las correlaciones encontradas en el grupo de los negativos: incremento del DAS28 y del HAQ con la edad de inicio del paciente. La correlación entre estas características de la AR y la edad inicial de los pacientes ya ha sido comentada en trabajos anteriores, pero sin referencia a los anticuerpos anti-CarP ya que no se analizaron en ninguno de ellos. Así, los pacientes de mayor edad en su conjunto presentaron una actividad de la enfermedad y una incapacidad funcional mayor que aquellos que iniciaron la enfermedad más temprano en estos estudios²⁶¹⁻²⁶³. Además, en alguno de estos trabajos se demuestra que las diferencias entre los pacientes de menor y mayor edad disminuyen a lo largo del seguimiento^{261,262}, algo que también se ha observado en el conjunto de pacientes anti-CarP negativos de nuestro trabajo. Así, lo que aportan nuestros resultados es demostrar que esta no es una característica global de los pacientes, sino que es específica de los pacientes que no presentan anticuerpos anti-CarP, quienes son además numéricamente mayoritarios.

La correlación del DAS28 y el HAQ con la edad de inicio de los pacientes también necesita algún tipo de explicación. Se podría pensar en la asociación entre la edad y la senescencia del sistema inmunitario, una idea que se ha utilizado para explicar la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes con la edad^{264,265}. Al margen de esta hipótesis, no

hay ningún mecanismo que permita explicar el incremento del DAS28 y el HAQ con la edad únicamente de los pacientes anti-CarP negativos.

Por último, es importante resaltar alguna de las limitaciones de esta parte del trabajo. Una de ellas guarda relación con el tratamiento inicial de los pacientes. Es importante notar que se ha utilizado un rango limitado de fármacos, y que ninguno de los pacientes ha sido tratado con FAMEs biológicos, ni tampoco con alguno de los FAMEs dirigidos. Además, el tratamiento de los pacientes no ha sido al azar, pues la mayor parte de los pacientes tratados fueron aquellos en los que se había hecho o se sospechaba el diagnóstico clínico de AR. Esta característica podría haber introducido un sesgo en los resultados relacionados con las visitas de seguimiento. Otra clara limitación es la pérdida de datos de una fracción de los pacientes a lo largo del seguimiento. Como ejemplo, a los 6 meses no estuvieron disponibles los datos de actividad del 35 % de los pacientes. Esta pérdida de datos, además de suponer una disminución de la potencia estadística, puede introducir un sesgo en los resultados, ya que es posible que el grupo de pacientes con datos completos no sea representativo del conjunto. En cualquier caso, es deseable estudiar otras cohortes de pacientes donde se hayan evitado estos posibles sesgos. Un ejemplo, podrían ser ensayos clínicos aleatorizados de estrategias de tratamiento de la EA en los que los brazos de tratamiento se adjudican al azar y se minimiza la pérdida de pacientes mediante una variedad de aproximaciones²⁶⁶.

En conjunto, la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la elevada actividad e incapacidad funcional de los pacientes que ha sido observada en varios estudios, junto con la consecuente diferencia en la tasa de remisión de los pacientes anti-CarP positivos y negativos, indican la posibilidad de utilizar a estos anticuerpos como biomarcadores pronósticos de la enfermedad.

5. ASOCIACIÓN INDEPENDIENTE DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CARP CON LA PÉRDIDA ÓSEA A NIVEL SISTÉMICO.

Los resultados del estudio de la DMO muestran que los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP se asocian con la pérdida ósea en la CoL y la CaT. Así, esta parte del proyecto muestra una conexión entre los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de hueso a nivel sistémico. Este resultado, sumado a la asociación de los anticuerpos anti-CarP con la presencia y progresión de erosiones^{26,142,144}, amplía el conocimiento acerca del papel patogénico que estos anticuerpos pueden tener sobre las lesiones óseas características de la AR. Nuestro trabajo ha sido el primero en valorar la relación entre los anticuerpos anti-CarP y la pérdida de la DMO en los pacientes con EA. Esto es algo que, por un lado impide contrastar los hallazgos obtenidos con trabajos previos, y por otro lado estimula la replicación de estos resultados en otras cohortes de pacientes para dar solidez a la relación de estos anticuerpos con la pérdida ósea a este nivel.

La coexistencia de los distintos autoanticuerpos en los pacientes con AR, dificulta la determinación de la contribución independiente de cada uno de ellos. La búsqueda del efecto independiente requiere de la estratificación de los pacientes en grupos pequeños, únicamente positivos para el anticuerpo a analizar. Esta tarea se ha hecho todavía más complicada en este trabajo, ya que la asociación exclusiva de los pacientes con títulos altos para los anticuerpos anti-CarP, obligó a incrementar el número de subgrupos a considerar, reduciendo todavía más el número de pacientes en cada uno de ellos. Aun con esta limitación, la contribución independiente de los anticuerpos anti-CarP respecto a los ACPA parece plausible. Los pacientes con títulos altos para los anticuerpos anti-CarP mostraron una disminución de la DMO tanto en los pacientes ACPA positivos como en los ACPA negativos, con un efecto similar en ambos grupos. Además, en un análisis previo realizado en la misma cohorte de pacientes, se descartó la contribución del FR sobre la pérdida ósea¹⁶¹. De esta forma, se puede afirmar que la relación de los anticuerpos anti-CarP con la disminución de la DMO es independiente tanto de los ACPA, como del FR.

La asociación exclusiva de los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP, permite hablar de un efecto de dosis sobre la pérdida ósea a nivel sistémico. Este resultado no resulta sorprendente, ya que trabajos previos han encontrado resultados similares para los ACPA. En pacientes con AR temprana¹⁶⁰ y AR establecida^{162,163}, los ACPA mostraron este efecto de

dosis en relación con la disminución de la DMO a nivel de la cadera. Además, en los pacientes con AR establecida, este mismo efecto de dosis con los títulos de ACPA se encontró a nivel de la CoL¹⁶². Sin embargo, no todos los estudios han sido concordantes. En la cohorte de pacientes con EA utilizada en este trabajo, los ACPA no mostraron un efecto de dosis en ninguna de las localizaciones analizadas¹⁶¹; y lo mismo ocurrió al nivel de la CoL en el trabajo realizado por *Bugatti S y col.* en pacientes con AR temprana¹⁶⁰. En relación con las erosiones, el efecto de dosis ha sido observado de forma mucho más congruente, ya que la contribución de los títulos de los ACPA se ha confirmado en la mayoría de los trabajos que han abordado esta relación²⁶⁷⁻²⁶⁹. Es posible que la dependencia de los títulos de anticuerpos se deba a un mero efecto de sensibilidad. Es decir, que la disminución de la masa ósea solo sea detectable al estar presente un cierto nivel de autoanticuerpos. Esta idea vendría apoyada por la publicación de *Kriskyamurthy A y col.*, donde la activación de los osteoclastos mediada por los ACPA es totalmente dependiente de la dosis de autoanticuerpos¹⁵⁸. Este efecto de dosis también podría estar relacionado con la diversidad de antígenos reconocidos por los anticuerpos. Se ha descrito que los pacientes con títulos altos para los ACPA presentan una mayor variedad de anticuerpos específicos frente a distintos tipos de proteínas citrulinadas⁴⁸, y esta mayor diversidad de autoanticuerpos podría justificar la disminución de la DMO más marcada en estos pacientes. Así, aunque todavía se necesitan más investigaciones, estas interpretaciones basadas en la información disponible con los ACPA también podrían explicar el efecto dependiente de dosis de los anticuerpos anti-CarP encontrado en nuestro trabajo.

La activación de los osteoclastos por parte de los ACPA se ha utilizado para explicar la asociación de estos anticuerpos con la pérdida de masa ósea. Se ha visto que no todos los ACPA tienen la misma capacidad para producir esta activación. Así, los anticuerpos frente a la vimentina y enolasa citrulinadas consiguen producir este efecto^{157,158}, mientras que los anticuerpos frente al fibrinógeno citrulinado parecen ser incapaces de llevar a cabo esta estimulación¹⁵⁸. La activación de los osteoclastos se ha utilizado para explicar los tres tipos de lesiones óseas típicas de la enfermedad: erosiones, pérdida yuxta-articular y pérdida ósea sistémica¹⁴⁷. La distinta contribución de los ACPA en cada una de ellas dependería de los mecanismos moleculares que intervengan conjuntamente con los anticuerpos¹⁵⁷. Por ejemplo, el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B contribuiría en la pérdida ósea localizada²⁷⁰; mientras que otras moléculas, como la proteína Dickopf 1, intervendrían en la

pérdida sistémica²⁷¹. Es posible que los anticuerpos anti-CarP contribuyan a la pérdida ósea a partir de mecanismos similares. Además, al igual que pasa con los ACPA, quizás no todos los anticuerpos anti-CarP tengan la capacidad para inducir degradación ósea. Sin embargo, hasta que no sean identificados los antígenos carbamilados innatos, estas dudas seguirán sin resolverse.

Algo llamativo de nuestros resultados es la falta de asociación entre los anticuerpos anti-CarP y la pérdida ósea en las articulaciones MCF, ya que esta es una de las localizaciones más afectadas en los pacientes con AR. En los pacientes de la cohorte utilizada, *Llorente I y col.*, tampoco encontraron asociación entre los ACPA y la pérdida ósea en las articulaciones MCF, a diferencia de lo observado en otras localizaciones¹⁶¹. Un factor que podría explicar esta falta de asociación es que como se trata de pacientes con EA, podría esperarse una menor pérdida de masa ósea debido al corto tiempo de evolución de su enfermedad. En contraste con esta explicación, en otros trabajos los ACPA se han asociado con una menor DMO en las articulaciones MCF²⁷²⁻²⁷⁴ de pacientes con AR establecida²⁷², y de pacientes con EA²⁷⁴ y con artralgia²⁷³, en los que también se esperaba una pérdida ósea menor por su enfermedad incipiente. Sin embargo, estos estudios muestran una clara diferencia respecto a nuestro trabajo. En ellos la DMO se cuantificó utilizando tomografía computarizada de alta resolución^{272,273} o radiogrametría²⁷⁴. Ambos métodos son más sensibles que DEXA, y específicamente en las MCF por el predominio de pérdida de masa ósea cortical asociado a la AR en esta localización^{275,276}. Esta circunstancia podría explicar la falta de asociación de los anticuerpos anti-CarP con la pérdida de masa ósea de las articulaciones MCF en nuestro estudio. Por lo tanto, la relación de estos anticuerpos con la DMO en esta localización es incierta, y está a la espera de nuevos estudios realizados con otras metodologías.

En definitiva, los resultados de esta tesis contribuyen a mejorar la caracterización de los anticuerpos anti-CarP en la AR. Han conseguido definir parte de los componentes genético y ambiental de la AR con presencia de los anticuerpos anti-CarP. También han demostrado que los anticuerpos anti-CarP podrán utilizarse en la clínica como biomarcadores pronósticos de mayor actividad e incapacidad, como biomarcadores de mayor pérdida sistémica de masa ósea, o como biomarcadores diagnósticos en la clasificación de los pacientes. El valor para la práctica clínica en estos papeles y las condiciones en los que pueden ser útiles también han

empezado a delimitarse con estos resultados. Sin embargo, dada su novedad, todavía es necesario confirmar algunos de los hallazgos encontrados en otras series de pacientes, así como buscar los mecanismos subyacentes que los expliquen. En este último sentido destaca la necesidad de modificar los modelos patogénicos que relacionan el tabaquismo con la AR y de encontrar los mecanismos por los que los anticuerpos anti-CarP se asocian con las erosiones y la pérdida de masa ósea sistémica. Sin duda el desconocimiento de los antígenos carbamilados limita la interpretación de estos resultados y el avance hacia resolver estas cuestiones. Sin embargo, es de esperar que tanto su identificación como el análisis del espectro de anticuerpos en los pacientes con AR permitan avanzar significativamente en la comprensión y el manejo de esta enfermedad.





CONCLUSIONES

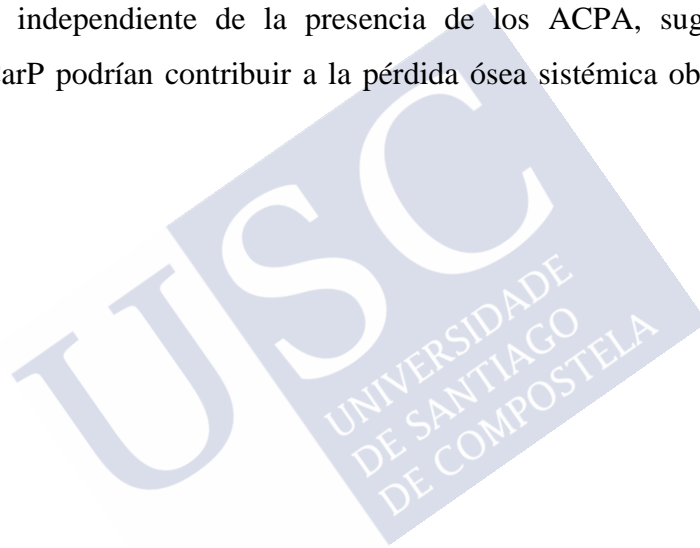


CONCLUSIONES

1. El alelo *03 de la molécula HLA-DRB1 se asocia de forma específica con la presencia de los anticuerpos anti-CarP en pacientes con AR. Este hallazgo sugiere mecanismos de presentación antigénica preferencial en la producción de estos autoanticuerpos y potencia la definición de los anticuerpos anti-CarP como un sistema de autoanticuerpos independiente.
2. El tabaco incrementa la susceptibilidad a la AR mediante vías que llevan a la producción simultánea de los tres autoanticuerpos característicos de la enfermedad, y en su defecto, únicamente a la producción de FR, excluyendo cualquier asociación con los anticuerpos anti-CarP o los ACPA. Estos resultados cuestionan los modelos patogénicos actuales, y sugieren un incremento de la expansión de epítomos mediada por el tabaquismo.
3. El valor de los anticuerpos anti-CarP para la clasificación de los pacientes con EA es inferior al del FR y los ACPA debido a su menor sensibilidad y frecuente concordancia con los otros autoanticuerpos. Su inclusión en los criterios ACR/EULAR del 2010 con el operador “or” permite clasificar algunos pacientes adicionales con una relación beneficio:coste de 1/4.
4. La presencia concordante de los tres autoanticuerpos específicos de la AR: RF, ACPA y anti-CarP, es una característica válida para la clasificación de los pacientes con EA. Esta característica permite diseñar criterios serológicos que clasifican mejor a los pacientes con AR que los criterios ACR/EULAR del 2010 utilizados en la actualidad.
5. Los anticuerpos anti-CarP se asocian con una mayor actividad de la enfermedad y una mayor incapacidad funcional en la primera visita de los pacientes con EA. Estas asociaciones son independientes del tratamiento inicial y de los otros autoanticuerpos. Por el contrario, muestran una interacción con la edad, ya que las diferencias en actividad e incapacidad son más marcadas en los pacientes de menor edad.
6. La asociación específica de los anticuerpos anti-CarP con una mayor actividad de la AR se mantiene a lo largo del seguimiento y es independiente del tratamiento inicial de los

pacientes. En consecuencia, la tasa de remisión es más baja en el grupo de pacientes positivos y así, estos resultados refuerzan la utilidad de los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores pronósticos.

7. La presencia de los anticuerpos anti-CarP separa a pacientes con EA que tienen características clínicas independientes de la edad, los positivos, de los que muestran un aumento de la actividad y de la incapacidad funcional con la edad, los negativos. Sin embargo, este es un hallazgo fortuito que necesita ser confirmado y explicado.
8. Los títulos altos de los anticuerpos anti-CarP se asocian con una disminución de la DMO en localizaciones alejadas de las articulaciones afectadas en los pacientes con EA. Esta asociación parece independiente de la presencia de los ACPA, sugiriendo que los anticuerpos anti-CarP podrían contribuir a la pérdida ósea sistémica observada en estos pacientes.





BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Shi, J. *et al.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17372–17377 (2011).
2. Jaisson, S. *et al.* Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. *Advances in Clinical Chemistry* **84**, 1–38 (2018).
3. Claxton, JS. *et al.* Endogenous carbamylation of renal medullary proteins. *PLoS One* **8**, e82655 (2013).
4. Kollipara, L. *et al.* Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact? *Proteomics* **13**, 941–944 (2013).
5. Long, J. *et al.* *Protein Carbamylation in Chronic Kidney Disease and Dialysis*. *Advances in Clinical Chemistry* **87**, 37–67 (2018).
6. Wang, Z. *et al.* Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat. Med.* **13**, 1176–1184 (2007).
7. Shi, J. *et al.* Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun. Rev.* **13**, 225–230 (2014).
8. Klebanoff, S J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 598–625 (2005).
9. Delporte, C. *et al.* Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of cyanide to cyanate: A potential carbamylation route involved in the formation of atherosclerotic plaques? *J. Biol. Chem.* **293**, 6374–6386 (2018).
10. Santana, JM. High-density lipoprotein carbamylation and dysfunction in vascular disease. *Front. Biosci.* **23**, 2227–2234 (2018).
11. Gorisse, L. *et al.* Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1191–1196 (2016).
12. Doyle, HA. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **24**, 112–8 (2012).
13. Bhat, S. *et al.* Immune response to chemically modified proteome. *Proteomics - Clin. Appl.* **8**, 19–34 (2014).
14. Mowen, KA. *et al.* Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 512–520 (2014).
15. Opendakker, G. *et al.* Microbiomic and Posttranslational Modifications as Preludes to Autoimmune Diseases. *Trends Mol. Med.* **22**, 746–757 (2016).
16. Moscarello, MA. *et al.* The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* **32**, 251–256 (2007).
17. Terzoglou, AG. *et al.* Preferential recognition of the phosphorylated major linear B-cell epitope of La/SSB 349–368aa by anti-La/SSB autoantibodies from patients with systemic autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 432–439 (2006).
18. Van Lummel, M. *et al.* Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes. *Diabetes* **63**, 237–247 (2014).
19. Trouw, LA. *et al.* Beyond citrullination: Other post-translational protein modifications in

- rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 331–339 (2017).
20. Takaba, H. *et al.* The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805–816 (2017).
 21. Doyle, HA. *et al.* Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol.* **22**, 443–449 (2001).
 22. Raposo, B. *et al.* T cells specific for post-translational modifications escape intrathymic tolerance induction. *Nat. Commun.* **9**, 353 (2018).
 23. Turunen, S. *et al.* Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. *Arthritis Rheum.* **62**, 3345–3352 (2010).
 24. Mydel, P. *et al.* Carbamylation-Dependent Activation of T Cells: A Novel Mechanism in the Pathogenesis of Autoimmune Arthritis. *J Immunol* **184**, 6882–6890 (2010).
 25. Scinocca, M. *et al.* Antihomocitrullinated fibrinogen antibodies are specific to rheumatoid arthritis and frequently bind citrullinated proteins/peptides. *J. Rheumatol.* **41**, 270–279 (2014).
 26. Montes, A. *et al.* Anti-Carbamylated Protein Antibodies as a Reproducible Independent Type of Rheumatoid Arthritis Autoantibodies. *PLoS One* **11**, e0161141 (2016).
 27. Brink, M. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 25 (2015).
 28. Nakabo, S. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies are detectable in various connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* **44**, 1384–1388 (2017).
 29. Challener, GJ. *et al.* Anti-carbamylated Protein Antibody Levels Correlate with Anti-Sa (Citrullinated Vimentin) Antibody Levels in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* **43**, 273–281 (2016).
 30. Pecani, A. *et al.* Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–8 (2016).
 31. Favoino, E. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies and skin involvement in patients with systemic sclerosis: An intriguing association. *PLoS One* **13**, 1–13 (2018).
 32. Bergum, B. *et al.* Antibodies against carbamylated proteins are present in primary Sjögren's syndrome and are associated with disease severity. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1494–1500 (2016).
 33. Ziegelasch, M. *et al.* Antibodies against carbamylated proteins and cyclic citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus: Results from two well-defined European cohorts. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–11 (2016).
 34. Muller, P.C. *et al.* Anticarbamylated protein (anti-CarP) antibodies are present in sera of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 2053–2055 (2013).
 35. López-Hoyos, M. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in patients with ageing associated inflammatory chronic disorders. *Rheumatol. (United Kingdom)* **55**, 764–766 (2016).
 36. Skopelja, S. *et al.* The role for neutrophil extracellular traps in cystic fibrosis autoimmunity. *JCI Insight* **1**, 1–12 (2016).
 37. Martínez, G. *et al.* Carbamylated vimentin represents a relevant autoantigen in Latin American (Cuban) rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.* **36**, 781–791 (2016).
 38. Reed, E. *et al.* Antibodies to carbamylated α -enolase epitopes in rheumatoid arthritis also bind citrullinated epitopes and are largely indistinct from anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–9 (2016).

39. Verheul, MK. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients of Asian descent: Fig. 1. *Rheumatology* **54**, 1930–1932 (2015).
40. Koppejan, H. *et al.* Role of Anti-Carbamylated Protein Antibodies Compared to Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Indigenous North Americans With Rheumatoid Arthritis, Their First-Degree Relatives, and Healthy Controls. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 2090–2098 (2016).
41. Mahler, M. *et al.* Diagnostic Utility of Anticarbamylated Protein Antibodies as Measured Using Carbamylated Fetal Calf Serum. *J Rheumatol* **45**, 438–439 (2018).
42. Smolen, JS. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Lancet* **388**, 2023–2038 (2016).
43. Smolen, JS. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim.* **4**, 18001 (2018).
44. Aletaha, D. *et al.* S. Diagnosis and Management of rheumatoid arthritis: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **320**, 1360–1372 (2018).
45. Scott, DL. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376**, 1094–108 (2010).
46. Kim, K. *et al.* Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 13–24 (2017).
47. Shelef, MA. *et al.* New relationships for old autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2019).
48. Willemze, A. *et al.* The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 144–152 (2012).
49. Song, YW. *et al.* Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *Qjm* **103**, 139–146 (2009).
50. Chatfield, SM. *et al.* Anti-citrullinated peptide antibody: Death of the rheumatoid factor? *Med. J. Aust.* **190**, 693–695 (2009).
51. Malmström, V. *et al.* The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 60–75 (2017).
52. Jiang, X. *et al.* Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* (2014).
53. Scinocca, M. *et al.* Antihomocitrullinated Fibrinogen Antibodies are Specific to Rheumatoid Arthritis and Frequently Bind Citrullinated Proteins/peptides. *J. Rheumatol.* **41**, 270–279 (2014).
54. Ajeganova, S. *et al.* The association between anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies and radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a study exploring replication and the added value to ACPA and rheumatoid factor. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 112–118 (2017).
55. van Wesemael, T. J. *et al.* Smoking is associated with the concurrent presence of multiple autoantibodies in rheumatoid arthritis rather than with anti-citrullinated protein antibodies per se: A multicenter cohort study. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–10 (2016).
56. Li, L. *et al.* Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-carbamylated protein antibody for rheumatoid arthritis. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
57. Janeway, CA. *et al.* The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. *Immunobiol. Immune Syst. Heal. Dis.* 1–9 (2001).
58. van Delft, MAM. *et al.* The isotype and IgG subclass distribution of anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 1–12 (2017).

59. Schroeder, HWJ. *et al.* Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–S52 (2010).
60. van Delft, MAM. *et al.* Secretory form of rheumatoid arthritis–associated autoantibodies in serum are mainly of the IgM isotype, suggesting a continuous reactivation of autoantibody responses at mucosal surfaces. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 146–148 (2019).
61. Holers, VM. *et al.* Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 542–557 (2018).
62. Scher, JU. *et al.* The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 569–578 (2011).
63. Van Delft, MAM. *et al.* The anti-carbamylated protein antibody response is of overall low avidity despite extensive isotype switching. *Rheumatol. (United Kingdom)* **57**, 1583–1591 (2018).
64. Lu, DR. *et al.* T Cell – Dependent Affinity Maturation and Innate Immune Pathways Differentially Drive Autoreactive B Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* **70**, 1732–1744 (2018).
65. Titcombe, PJ. *et al.* Pathogenic Citrulline-Multispecific B Cell Receptor Clades in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1933–1945 (2018).
66. Suwannalai, P. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens. *Ann Rheum Dis* **70**, 373–379 (2011).
67. Du, X. *et al.* Insights into Protein – Ligand Interactions : Mechanisms , Models , and Methods. *Int J Mol Sci.* **17**, 1–34 (2016).
68. Trier, NH. *et al.* The use of synthetic peptides for detection of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Methods* **454**, 6–14 (2018).
69. Pratesi, F. *et al.* Fingerprinting of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA): Specificity, isotypes and subclasses. *Lupus* **24**, 433–441 (2015).
70. Trouw, LA. *et al.* Autoimmunity in rheumatoid arthritis: Different antigens - Common principles. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1–5 (2013).
71. Lac, P. *et al.* Relatedness of antibodies to peptides containing homocitrulline or citrulline in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **45**, 302–309 (2018).
72. Shi, J. *et al.* Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the ‘AMC-Senshu’ method. *Ann Rheum Dis* **72**, 148–150 (2013).
73. Jiang, X. *et al.* Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1761–1768 (2014).
74. Holmdahl, R. The specificity of monoclonal anti–citrullinated protein antibodies: comment on the article by Steen *et al.* *Arthritis Rheumatol.* **71**, 324–325 (2019).
75. Holmdahl, R. Reply. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 325–327 (2019).
76. Steen, J. *et al.* Recognition of Amino Acid Motifs , Rather Than Specific Proteins , by Human Plasma Cell – Derived Monoclonal Antibodies to Posttranslationally Modified Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 196–209 (2019).
77. Juarez, M. *et al.* Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1099–1107 (2016).
78. Figueiredo, CP. *et al.* Antimodified protein antibody response pattern influences the risk for

- disease relapse in patients with rheumatoid arthritis tapering disease modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 399–407 (2017).
79. Ingegnoli, F. *et al.* Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis. Markers* **35**, 727–734 (2013).
80. MacGregor, AJ. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* **43**, 30–37 (2002).
81. Raychaudhuri, S. *et al.* Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **44**, 291–6 (2012).
82. Han, B. *et al.* Fine mapping seronegative and seropositive rheumatoid arthritis to shared and distinct HLA alleles by adjusting for the effects of heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **94**, 522–532 (2014).
83. Van Der Woude, D. *et al.* Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 916–923 (2009).
84. Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376–381 (2014).
85. Holoshitz, J. *et al.* The Rheumatoid Arthritis HLA-DRB1 Shared Epitope. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**, 293–8 (2010).
86. Huizinga, TWJ. *et al.* Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* **52**, 3433–3438 (2005).
87. Irigoyen, P. *et al.* Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: Contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum.* **52**, 3813–3818 (2005).
88. Scally, SW. *et al.* Molecular basis for increased susceptibility of Indigenous North Americans to seropositive rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1915–1923 (2017).
89. Scally, SW. *et al.* A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **210**, 2569–2582 (2013).
90. Van Der Woude, D. *et al.* Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: A meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein. *Arthritis Rheum.* **62**, 1236–1245 (2010).
91. Verpoort, KN. *et al.* Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 3058–3062 (2005).
92. Thomson, W. *et al.* Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* **39**, 1431–1433 (2007).
93. Stahl, EA. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* **42**, 508–514 (2010).
94. Eyre, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **44**, 1336–1340 (2012).
95. Raychaudhuri, S. *et al.* Genetic variants CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated to RA risk. *Nat. Genet.* **41**, 1313–1318 (2011).
96. Begovich, AB. *et al.* A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 330–337 (2004).

97. Remmers, EF. *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* **357**, 977–86 (2007).
98. Barton, A. *et al.* Identification of novel RA susceptibility loci at chromosomes 10p15 , 12q13 and 22q13. *Nat Genet* **40**, 1156–1159 (2009).
99. Morgan, AW. *et al.* Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK caucasian population. *Arthritis Rheum.* **60**, 2565–2576 (2009).
100. Sugiyama, D. *et al.* Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 70–81 (2010).
101. Di Giuseppe, D. *et al.* Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: A dose-response meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 1–7 (2014).
102. Hoovestol, RA. *et al.* Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk. *Curr. Rheumatol. Rep.* **13**, 431–9 (2011).
103. Källberg, H. *et al.* Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann. Intern. Med.* **70**, 508–511 (2011).
104. Padyukov, L. *et al.* A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 3085–3092 (2004).
105. Criswell, L. A. *et al.* Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1163–1167 (2006).
106. Kallberg, H. *et al.* Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 867–75 (2007).
107. Klareskog, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* **54**, 38–46 (2006).
108. Bongartz, T. *et al.* Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **46**, 70–75 (2007).
109. Lugli, E. B. *et al.* Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 1–8 (2015).
110. Demoruelle, MK. *et al.* Airways abnormalities and rheumatoid arthritis-related autoantibodies in subjects without arthritis: early injury or initiating site of autoimmunity? *Arthritis Rheum* **64**, 1756–61 (2012).
111. Reynisdottir, G. *et al.* Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 31–39 (2014).
112. Reynisdottir, G. *et al.* Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1722–1727 (2016).
113. Willis, VC. *et al.* Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. *Arthritis Rheum* **65**, 2545–54 (2013).
114. Hedström, AK. *et al.* Smoking, HLA-genes and serology in rheumatoid arthritis; complex

- relationships investigated in the Swedish EIRA case-control study. *Arthritis Rheumatol.* (2019).
115. Van Steenberghe, H. W. *et al.* Characterising arthralgia in the preclinical phase of rheumatoid arthritis using MRI. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1225–1232 (2015).
116. Gerlag, DM. *et al.* EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: Report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 638–641 (2012).
117. Orozco, G. *et al.* Auto-antibodies, HLA and PTPN22: Susceptibility markers for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47**, 138–141 (2008).
118. González-Álvarez, I. *et al.* Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
119. Machold, KP. *et al.* The Austrian Early Arthritis Registry. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**, S113–7 (2003).
120. Schumacher, HR. *et al.* Predictive Factors in Early Arthritis: Long-Term Follow-up. *Semin. Arthritis Rheum.* **33**, 264–272 (2004).
121. Zeidler, H. *et al.* Early arthritis and rheumatoid arthritis in Germany. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**, S106–12 (2003).
122. Quinn, MA. *et al.* Prognostic Factors in a Large Cohort of Patients With Early Undifferentiated Inflammatory Arthritis After Application of a Structured Management Protocol. *Arthritis Rheum.* **48**, 3039–3045 (2003).
123. van Aken, J. *et al.* The Leiden Early Arthritis Clinic. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**, S100–5 (2003).
124. Symmons, DPM. *et al.* Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res. Ther.* **8**, 1–6 (2006).
125. Jansen, LMA. *et al.* One year outcome of undifferentiated polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 700–703 (2002).
126. Hitchon, CA. *et al.* Early undifferentiated arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **31**, 605–626 (2005).
127. Demoruelle, MK. *et al.* Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **14**, 472–480 (2012).
128. Hua, C. *et al.* Diagnosis, prognosis and classification of early arthritis: Results of a systematic review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *RMD Open* **3**, 1–10 (2017).
129. Harrison, B. *et al.* Early inflammatory polyarthritis: Results from the Norfolk arthritis register with a review of the literature. I. risk factors for the development of inflammatory polyarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **39**, 835–843 (2000).
130. Rantapää-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2741–2749 (2003).
131. Nielen, MMJ. *et al.* Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis Rheum.* **50**, 380–386 (2004).
132. Majka, DS. *et al.* Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 801–807 (2008).

133. Bos, WH. *et al.* Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anti-citrullinated protein antibody status: A prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 490–494 (2010).
134. ten Brinck, RM. *et al.* The risk of individual autoantibodies, autoantibody combinations and levels for arthritis development in clinically suspect arthralgia. *Rheumatol. (United Kingdom)* **56**, 2145–2153 (2017).
135. Mjaavatten, M. *et al.* The likelihood of persistent arthritis increases with the level of anti-citrullinated peptide antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor: a longitudinal study of 376 patients with very undifferentiated arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R76 (2010).
136. Van Der Woude, D. *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1554–1561 (2010).
137. Van De Stadt, LA. *et al.* Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 3226–3233 (2011).
138. Sokolove, J. *et al.* Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
139. Brink, M. *et al.* Multiplex analyses of antibodies against citrullinated peptides in individuals prior to development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 899–910 (2013).
140. Shi, J. *et al.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 780–3 (2014).
141. Gan, RW. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *J. Rheumatol.* **42**, 572–579 (2015).
142. Brink, M. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 25 (2015).
143. Shi, J. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 911–915 (2013).
144. Shi, J. *et al.* The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 339 (2015).
145. Truchetet, ME. *et al.* Association of the Presence of Anti-Carbamylated Protein Antibodies in Early Arthritis With a Poorer Clinical and Radiologic Outcome: Data From the French ESPOIR Cohort. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 2292–2302 (2017).
146. Humphreys, JH. *et al.* Anticarbamylated protein antibodies are associated with long-term disability and increased disease activity in patients with early inflammatory arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. 1–6 (2015).
147. Kleyer, A. *et al.* Arthritis and bone loss: A hen and egg story. *Curr. Opin. Rheumatol.* **26**, 80–84 (2014).
148. Gravallesse, E. *et al.* Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* **8**, 656–664 (2014).
149. Goldring, SR. *et al.* Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: Diagnosis and therapeutic implications. *Arthritis Res.* **2**, 33–37 (2000).
150. Sapir-Koren, R. *et al.* Postmenopausal osteoporosis in rheumatoid arthritis: The estrogen deficiency-immune mechanisms link. *Bone* **103**, 102–115 (2017).
151. Haugeberg, G. *et al.* Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients

- with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 522–530 (2000).
152. Leventis, P. *et al.* Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47**, 1617–1621 (2008).
153. Smolen, JS. *et al.* Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 473–488 (2003).
154. Güler-Yüksel, M. *et al.* Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 330–336 (2009).
155. Mangnus, L. *et al.* Bone mineral density loss in clinically suspect arthralgia is associated with subclinical inflammation and progression to clinical arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **46**, 364–368 (2017).
156. Schett, G. *et al.* Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* **8**, 656–664 (2014).
157. Harre, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **122**, 1791–1802 (2012).
158. Krishnamurthy, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying Rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 721–729 (2016).
159. Hecht, C. *et al.* Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 2151–2156 (2015).
160. Bugatti, S. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–8 (2016).
161. Llorente, I. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies are associated with decreased bone mineral density: baseline data from a register of early arthritis patients. *Rheumatol. Int.* **37**, 799–806 (2017).
162. Orsolini, G. *et al.* Titer-Dependent Effect of Anti-Citrullinated Protein Antibodies On Systemic Bone Mass in Rheumatoid Arthritis Patients. *Calcif. Tissue Int.* **101**, 17–23 (2017).
163. Wysham, KD. *et al.* Association of High Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Seropositivity and Lean Mass Index With Low Bone Mineral Density in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* **70**, 961–969 (2018).
164. Wolfe, F. *et al.* The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **37**, 481–494 (1994).
165. Myasoedova, E. *et al.* Epidemiology of rheumatoid arthritis: Rheumatoid arthritis and mortality. *Curr. Rheumatol. Rep.* **12**, 379–385 (2010).
166. Widdifield, J. *et al.* Trends in excess mortality among patients with rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis Care Res.* **67**, 1047–1053 (2015).
167. Sparks, JA. *et al.* Rheumatoid Arthritis and Mortality among Women during 36 Years of Prospective Follow-Up: Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Care Res.* **68**, 753–762 (2016).
168. Lassere, MN. *et al.* How many life years are lost in patients with rheumatoid arthritis? Secular cause-specific and all-cause mortality in rheumatoid arthritis, and their predictors in a long-term Australian cohort study. *Intern. Med. J.* **43**, 66–72 (2013).
169. Sherine, EG. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *Am J Med* **121**, S9–12 (2008).
170. Young, A. *et al.* Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in

- ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology* **46**, 350–357 (2007).
171. England, BR. *et al.* Cause-Specific Mortality in Male US Veterans with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* **68**, 36–45 (2016).
 172. Joseph, RM. *et al.* Smoking-Related Mortality in Patients With Early Rheumatoid Arthritis: A Retrospective Cohort Study Using the Clinical Practice Research Datalink. *Arthritis Care Res.* **68**, 1598–1606 (2016).
 173. Ajeganova, S. *et al.* Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1924–1932 (2016).
 174. Sihvonen, S. *et al.* The predictive value of rheumatoid factor isotypes, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, and antineutrophil cytoplasmic antibodies for mortality in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 2089–2094 (2005).
 175. Humphreys, J. *et al.* Rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibody positivity, but not level, are associated with increased mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from two large independent cohorts. *Ann. Rheum. Dis.* **16**, 483 (2014).
 176. Mikuls, TR. *et al.* Associations of disease activity and treatments with mortality in men with rheumatoid arthritis: Results from the VARA registry. *Rheumatology* **50**, 101–109 (2011).
 177. Vidal-Bralo, L. *et al.* Anti-carbamylated protein autoantibodies associated with mortality in Spanish rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* **12**, 1–14 (2017).
 178. van Riel, PL. *et al.* The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **34**, 40–44 (2016).
 179. van Riel, PL. The development of the disease activity score (DAS) and the disease activity score using 28 joint counts (DAS28). *Clin. Exp. Rheumatol.* **32**, S65–S74 (2014).
 180. Fransen, J. *et al.* The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **35**, 745–757 (2009).
 181. Smolen, JS. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 960–977 (2017).
 182. Singh, JA. *et al.* 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **68**, 1–25 (2016).
 183. Lau, CS. *et al.* Aplar rheumatoid arthritis treatment recommendations. *Int. J. Rheum. Dis.* **18**, 685–713 (2015).
 184. Van Nies, JAB. *et al.* What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 861–870 (2014).
 185. Nell, VPK. *et al.* Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **43**, 906–914 (2004).
 186. van der Heide, A. *et al.* The effectiveness of early treatment with ‘second-line’ antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* **124**, 699–707 (1996).
 187. Conaghan, PG. *et al.* Elucidation of the relationship between synovitis and bone damage: A randomized magnetic resonance imaging study of individual joints in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 64–71 (2003).

188. Korpela, M. *et al.* Retardation of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis by initial aggressive treatment with disease-modifying antirheumatic drugs: Five-year experience from the FIN-RACo study. *Arthritis Rheum.* **50**, 2072–2081 (2004).
189. Landewé, RBM. *et al.* COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: Long-term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis Rheum.* **46**, 347–356 (2002).
190. Quinn, MA. *et al.* Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: Possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**, S154–7 (2003).
191. Combe, B. *et al.* 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann. Intern. Med.* **76**, 948–959 (2017).
192. Derksen, VFA. M. *et al.* Anti-Carbamylated Protein Antibodies and Higher Baseline Disease Activity in Rheumatoid Arthritis—A Replication Study in Three Cohorts: Comment on the Article by Truchetet *et al.* *Arthritis Rheumatol.* **70**, 2096–2097 (2018).
193. Maska, L. *et al.* Measures of functional status and quality of life in rheumatoid arthritis: Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ), Modified Health Assessment Questionnaire (MHAQ), Multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ), Health Assessment. *Arthritis Care Res.* **63**, 4–13 (2011).
194. Gossec, L. *et al.* Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: A multiparameter prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 675–680 (2004).
195. Albrecht, K. *et al.* Poor prognostic factors guiding treatment decisions in rheumatoid arthritis patients: A review of data from randomized clinical trials and cohort studies. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 1–8 (2017).
196. Baganz, L. *et al.* Are prognostic factors adequately selected to guide treatment decisions in patients with rheumatoid arthritis? A collaborative analysis from three observational cohorts. *Semin. Arthritis Rheum.* **48**, 976–982 (2019).
197. Ajeganova, S. *et al.* Evaluation of the association between anticarbamylated protein antibodies and longitudinal course of functional ability in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, e15–e15 (2016).
198. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62**, 2569–2581 (2010).
199. Arnett, FC. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315–24 (1988).
200. Nishimura, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* **146**, 797–808 (2007).
201. Shi, J. *et al.* The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res. Ther* **17**, 1–6 (2015).
202. Van Gaalen, FA. *et al.* Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis: A Prospective Cohort Study. *Arthritis Rheum.* **50**, 709–715 (2004).
203. Raza, K. *et al.* Predictive Value of Antibodies to Cyclic Citrullinated Peptide in Patients with Very Early Inflammatory Arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 231–238 (2005).
204. Radner, H. *et al.* Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 114–123 (2014).
205. Van Der Helm-van Mil, AHM. *et al.* The 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis:

- Do they affect the classification or diagnosis of rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1596–1598 (2012).
206. van der Helm-van Mil, AHM. *et al.* What is rheumatoid arthritis? Considering consequences of changed classification criteria. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 315–317 (2017).
207. Mjaavatten, MD. *et al.* Early rheumatoid arthritis: The performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **27**, 451–466 (2013).
208. Verheul, MK. *et al.* Triple Positivity for Anti-Citrullinated Protein Autoantibodies, Rheumatoid Factor, and Anti-Carbamylated Protein Antibodies Conferring High Specificity for Rheumatoid Arthritis: Implications for Very Early Identification of At-Risk Individuals. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1721–1731 (2018).
209. Boeters, DM. *et al.* Does information on novel identified autoantibodies contribute to predicting the progression from undifferentiated arthritis to rheumatoid arthritis: A study on anti-CarP antibodies as an example. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 1–5 (2018).
210. Jones, JD. *et al.* Brief Report: Anti-Carbamylated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients Are Reactive With Specific Epitopes of the Human Fibrinogen β -Chain. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 1381–1386 (2017).
211. Yu, HC. *et al.* Increased serum levels of anti-carbamylated 78-kDa glucose-regulated protein antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, E1510 (2016).
212. Nakabo, S. *et al.* Carbamylated albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. *Rheumatol. (United Kingdom)* **56**, 1217–1226 (2017).
213. Verheul, MK. *et al.* Identification of carbamylated alpha 1 anti-trypsin (A1AT) as an antigenic target of anti-CarP antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **80**, 77–84 (2017).
214. Takizawa, Y. *et al.* Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1013–1020 (2006).
215. Kinloch, A. *et al.* Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R1421–9 (2005).
216. Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6**, R142–R150 (2004).
217. Dekkers, J. S. *et al.* Breach of autoreactive B cell tolerance by post-translationally modified proteins. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1449–1457 (2017).
218. O’Neil, L. J. *et al.* Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends Mol. Med.* **25**, 215–227 (2019).
219. Corsiero, E. *et al.* NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* **7**, 1–9 (2016).
220. Carmona-Rivera, C. *et al.* Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* **2**, eaag3358 (2017).
221. Rigby, WFC. *et al.* Editorial: Anti-Citrullinated Protein Antibody, Anti-Carbamylated Protein Antibody, and Rheumatoid Arthritis: Azurophilic Granules Sing the Blues. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 2251–2255 (2017).
222. Turunen, S. *et al.* Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–15 (2016).
223. Manganelli, V. *et al.* Autophagy induces protein carbamylation in fibroblast-like synoviocytes

- from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **57**, 2032–2041 (2018).
224. Bartok, B. *et al.* Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–55 (2010).
225. Ceccarelli, F. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies as a new biomarker of erosive joint damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 1–8 (2018).
226. Massaro, L. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in systemic lupus erythematosus patients with articular involvement. *Lupus* **27**, 105–111 (2018).
227. Moore, TL. *et al.* Anti- Carbamylated Protein Antibodies in Juvenile Idiopathic Arthritis : A New Biomarker. *J Autoimmun Res.* **4**, 4–6 (2017).
228. Corrales, A. *et al.* Cardiovascular risk stratification in rheumatic diseases: Carotid ultrasound is more sensitive than coronary artery calcification score to detect subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1764–1770 (2013).
229. Abasolo, L. *et al.* Influence of demographic and clinical factors on the mortality rate of a rheumatoid arthritis cohort: A 20-year survival study. *Semin. Arthritis Rheum.* **45**, 533–538 (2016).
230. Hafström, I. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies are associated with osteopenia but not with pain at diagnosis of rheumatoid arthritis: Data from the BARFOT cohort. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 1–9 (2019).
231. Saevarsdottir, S. *et al.* Patients with early rheumatoid arthritis who smoke are less likely to respond to treatment with methotrexate and tumor necrosis factor inhibitors: Observations from the epidemiological investigation of rheumatoid arthritis and the Swedish Rheumatology Reg. *Arthritis Rheum.* **63**, 26–36 (2011).
232. Symmons, DPM. *et al.* The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: Results from the norfolk arthritis register. *Rheumatology* **33**, 735–739 (1994).
233. Jia, X. *et al.* Imputing Amino Acid Polymorphisms in Human Leukocyte Antigens. *PLoS One* **8**, e64683 (2013).
234. Brown, WM. *et al.* Overview of the MHC fine mapping data. *Diabetes Obes Metab* **11**, 2–7 (2009).
235. Montes, A. *et al.* Association of anti-citrullinated vimentin and anti-citrullinated α -enolase antibodies with subsets of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3102–3110 (2012).
236. Hajian-Tilaki, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Casp. J. Intern. Med.* **4**, 627–35 (2013).
237. Muller, R. *et al.* Logistic regression and CART in the analysis of multimarker studies. *Clin. Chim. Acta* **394**, 1–6 (2008).
238. Burnham, KP. *et al.* Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach. *New York: Springer-Verlag.* **2**, (2004).
239. Ahn, E. *et al.* Introduction to Systematic Review and Meta-Analysis: A Health Care Perspective. *Korean J. Anesthesiol.* **71**, 1–38 (2018).
240. Guido, S. meta: An R package for meta-analysis. *R News* **7**, 40–45 (2007).
241. Siemons, L. *et al.* How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* **15**, 368 (2014).
242. Jeffreys, AJ. *et al.* Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat. Genet.* **29**, 217–222 (2001).

243. Blum, JS. *et al.* Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* **31**, 443–73 (2013).
244. Johnson, DS. *et al.* Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* **66**, 813–821 (2014).
245. Linn-Rasker, SP. *et al.* Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 366–371 (2006).
246. Pedersen, M. *et al.* Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: A nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum.* **56**, 1446–1453 (2007).
247. Lee, HS. *et al.* Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: A mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* **56**, 1745–1753 (2007).
248. Vanderlugt, CL. *et al.* Epitope spreading in immune-mediated diseases: Implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 85–95 (2002).
249. Cornaby, C. *et al.* B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* **163**, 56–68 (2015).
250. Costenbader, KH. *et al.* Cigarette smoking and autoimmune disease what can we learn from epidemiology? *Lupus* **15**, 737–45 (2006).
251. Qiu, F. *et al.* Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget* **8**, 268–284 (2017).
252. Freemer, MM. *et al.* Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 581–584 (2006).
253. Chinoy, H. *et al.* Interaction of HLA-DRB1*03 and smoking for the development of anti-Jo-1 antibodies in adult idiopathic inflammatory myopathies: a European-wide case study. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 961–5 (2012).
254. Korpilähde, T. *et al.* Smoking history and serum cotinine and thiocyanate concentrations as determinants of rheumatoid factor in non-rheumatoid subjects. *Rheumatology* **43**, 1424–1428 (2004).
255. Newkirk, MM. *et al.* Chronic smoke exposure induces rheumatoid factor and anti-heat shock protein 70 autoantibodies in susceptible mice and humans with lung disease. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1051–1061 (2012).
256. Brink, M. *et al.* Rheumatoid factor isotypes in relation to antibodies against citrullinated peptides and carbamylated proteins before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–11 (2016).
257. Chang, MH. *et al.* Antibody-dependent and -independent mechanisms of inflammatory arthritis. *JCI Insight* **4**, 1–15 (2019).
258. Aletaha, D. *et al.* Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 1–10 (2015).
259. Tan, E. M. *et al.* Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *J. Exp. Med.* **213**, 1937–1950 (2016).
260. Villa-blanco, JI. *et al.* Elderly Onset Rheumatoid Arthritis: differential diagnosis and choice of first-line and subsequent therapy. **26**, 739–750 (2009).
261. Mueller, RB. *et al.* Is radiographic progression of late-onset rheumatoid arthritis different from

- young-onset rheumatoid arthritis? Results from the swiss prospective observational cohort. *Rheumatol. (United Kingdom)* **53**, 671–677 (2014).
262. Innala, L. *et al.* Age at onset determines severity and choice of treatment in early rheumatoid arthritis: A prospective study. *Arthritis Res. Ther.* **16**, (2014).
263. Krams, T. *et al.* Effect of age at rheumatoid arthritis onset on clinical, radiographic, and functional outcomes: The ESPOIR cohort. *Jt. Bone Spine* **83**, 511–515 (2016).
264. Chalan, P. *et al.* Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging. *Curr. Aging Sci.* **8**, 131–146 (2015).
265. Boots, AMH. *et al.* The influence of ageing on the development and management of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 604–613 (2013).
266. Randomized, A. *et al.* Clinical and Radiographic Outcomes of Four Different Treatment Strategies in Patients With Early Rheumatoid Arthritis (the BeSt Study). *Arthritis Rheum* **52**, 3381–3390 (2005).
267. Degboé, Y. *et al.* Predictive value of autoantibodies from anti-CCP2, anti-MCV and anti-human citrullinated fibrinogen tests, in early rheumatoid arthritis patients with rapid radiographic progression at 1 year: Results from the ESPOIR cohort. *RMD Open* **1**, 1–8 (2015).
268. Syversen, SW. *et al.* High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: Results from a 10-year longitudinal study. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 212–217 (2008).
269. Syversen, SW. *et al.* Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: Results from a 10-year prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 345–351 (2010).
270. Martínez-Calatrava, MJ. *et al.* RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R149 (2012).
271. Heiland, GR. *et al.* Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 2152–2159 (2010).
272. Kocijan, R. *et al.* Differences in bone structure between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients relative to autoantibody positivity. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2022–2028 (2014).
273. Kleyer, A. *et al.* Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 854–860 (2014).
274. Bøyesen, P. *et al.* Antibodies to cyclic citrullinated protein and erythrocyte sedimentation rate predict hand bone loss in patients with rheumatoid arthritis of short duration: A longitudinal study. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 1–9 (2009).
275. Jensen, T. *et al.* Comparison of dual X-ray absorptiometry (DXA), digital X-ray radiogrammetry (DXR), and conventional radiographs in the evaluation of osteoporosis and bone erosions in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **34**, 27–33 (2005).
276. Hoff, M. *et al.* Hand bone loss as an outcome measure in established rheumatoid arthritis: 2-year observational study comparing cortical and total bone loss. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 1–8 (2007).



ANEXOS

Anexo 1. Regueiro C, Rodriguez-Rodriguez L, Triguero-Martinez A, et al. Specific Association of HLA-DRB1*03 With Anti-Carbamylated Protein Antibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(3):331–339.

Anexo 2. Regueiro C, Nuño L, et al. Value of Measuring Anti-Carbamylated Protein Antibodies for Classification on Early Arthritis Patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):12023.

Anexo 3. Regueiro C, Rodríguez-Martínez L et al. Improved RA classification among early arthritis patients with the concordant presence of three RA autoantibodies: analysis in two early arthritis clinics. *Arthritis Res. Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):280.

Anexo 4. Regueiro C, Ortiz AM, Boveda MD, Castañeda S, Gonzalez-Alvaro I, Gonzalez A. Association of high titers of anti-carbamylated protein antibodies with decreased bone mineral density in early arthritis patients. *PLoS One.* 2018;13(8):e0202583. Published 2018 Aug 17. doi:10.1371/journal.pone.0202583

Anexo 5. Copia del informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CEIC). Código de Registro: 2014/387.

Anexo 6. Copia del informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CEIC). Código de Registro: 2017/514.



Anexo 1:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.40738>





Anexo 2:

<https://www.nature.com/articles/s41598-017-09657-5>





Anexo 3:

<https://arthritis->

[research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-019-2079-4](https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-019-2079-4)





Anexo 4:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0202583>

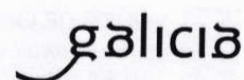






XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881542726 - Fax: 881542728
www.sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonomo de Ética de la Investigación de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 30/09/2014 el estudio:

Título: Nuevas aproximaciones para la identificación de biomarcadores de predicción de respuesta al tratamiento en pacientes con artritis reumatoide

Promotor: Acción Estratégica de Salud 2014 del Instituto de Salud Carlos III

Tipo de estudio: EPA SP

Código del Promotor: PI14/01651

Código de Registro: 2014/387

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIC de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago (IDIS)	Antonio González Martínez Pedrayo

NOTA: Incluir la opción de consentimiento oral ante testigos





XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881542726 - Fax: 881542728
www.sergas.es



Y HACE CONSTAR QUE:

1. El CAEIG cumple los requisitos legales vigentes (R.D 223/2004 por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).
2. El CAEIG tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del CAEIG es:

Manuel Portela Romero. (Presidente). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.

Paula Mª López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.

Juan Vázquez Lago (Secretario Suplente). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.

Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.

Xoán X. Casas Rodríguez. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juana Mª Cruz del Río. Trabajadora Social.

Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.

José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.

José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.

Marta Gil Pérez. Licenciada en Derecho. Miembro externo

Pilar Gayoso Diz. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria

Salvador Pita Fernández. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.

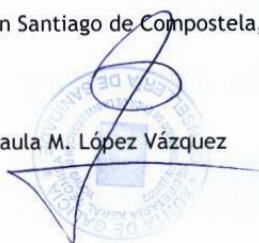
Susana María Romero Yuste. Médico Especialista en Reumatología.

Teresa Vázquez Pumariño. Diplomada Universitaria de Enfermería.

Mª Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

En Santiago de Compostela, a 02 de octubre de 2014

Paula M. López Vázquez



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Cristina Márquez Riveras, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/09/18 el estudio:

Título: Búsqueda de biomarcadores de utilidad para el manejo de la artritis reumatoide, desde el inicio de la clínica hasta el aumento de mortalidad

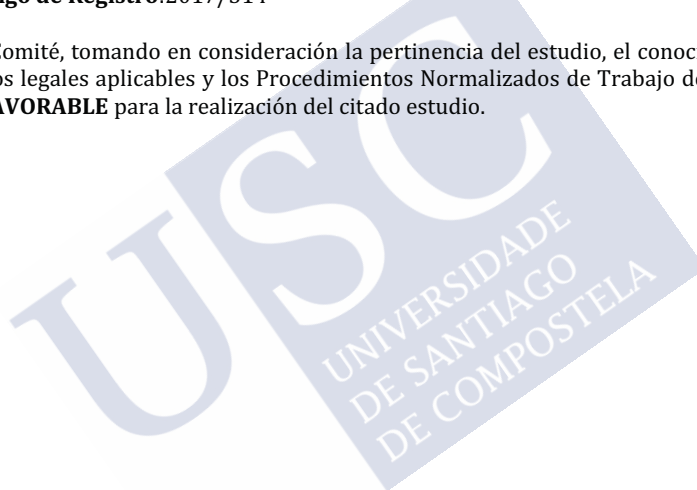
Versión:

Promotor/a: Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad

Investigador/a: Antonio González Martínez-Pedrayo

Código de Registro: 2017/514

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 25/09/2018 15:11
J4G4-BOAH-OFC3-4215-3788-1091-674

Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente)**. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Cristina Márquez Riveras (Secretaria)**. Enfermera. Dirección Xeral de Saúde Pública.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Secretario Suplente)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez**. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez**. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira**. Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz**. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Guillermo José Prada Ramallal** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Carlos Rodríguez Moreno**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Sandra Vidal Martínez**. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago
- **Rafael Carlos Vidal Pérez**. Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Cristina Márquez Riveras



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 25/09/2018 15:11
J4G4-BOAH-OFC3-4215-3788-1091-674