ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Lorena
Rodríguez Martínez

Tesis doctoral

Análisis en la artritis reumatoide de anticuerpos atípicos frente a proteínas modificadas postraduccionalmente

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DE DOCTORADO

ANÁLISIS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE DE ANTICUERPOS ATÍPICOS FRENTE A PROTEÍNAS MODIFICADAS POSTRADUCCIONALMENTE

Lorena Rodríguez Martínez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

D./Dña. **Lorena Rodríguez Martínez**

Título de la tesis: **Análisis en la artritis reumatoide de anticuerpos atípicos frente a proteínas modificadas postraduccionalmente**

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) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) 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.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico-

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 22 de noviembre de 2021.

Fdo. Lorena Rodríguez Martínez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Análisis en la artritis reumatoide de anticuerpos atípicos frente a proteínas modificadas postraduccionalmente

D. Antonio González Martínez-Pedrayo

Dª. Celia María Pombo Ramos

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dª. Lorena Rodríguez Martínez, bajo mi dirección/tutorización, 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 esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 19 de noviembre de 2021

Fdo. Antonio González Martínez-Pedrayo (director)

Fdo. Celia María Pombo Ramos (tutora)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

D./Dña. **Lorena Rodríguez Martínez**

Título de la tesis: **Análisis en la artritis reumatoide de anticuerpos atípicos frente a proteínas modificadas postraduccionalmente**

Declaro que no tengo ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 22 de noviembre de 2021.

Fdo. Lorena Rodríguez Martínez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mi familia

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Estas palabras van dirigidas a todas las personas que han formado parte de esta etapa en mi vida.

Cristina, tú tenías que ser la primera. No puedo reflejar aquí todo lo que has significado para mí, pero creo que te haces una idea. Has sido la persona que más me ha apoyado y mejor me ha entendido en todo este tiempo. Tú me has dado cariño, confianza, ayuda y risas, sobre todo me quedo con las risas. He tenido la enorme suerte de tenerte a mi lado y de poder compartir muy buenos momentos contigo, momentos sencillos pero cargados de significado. Has sabido animarme y motivarme en las épocas más difíciles, dándome fuerzas para seguir adelante a pesar de las adversidades. Tu nueva vida fuera del laboratorio supuso un antes y un después para mí. Sin embargo, recordar nuestras conversaciones y nuestras risas me ha ayudado a seguir adelante. Estoy convencida de que sin ti no habría llegado hasta aquí, no sólo por todo lo que has enseñado a nivel laboral, que ha sido muchísimo, sino por ser una persona tan increíblemente maravillosa. Tengo el gran privilegio de poder llamarte amiga. Nos vemos pronto.

Mis siguientes palabras son para Carmen, nuestra maravillosa técnico. Si durante todo este tiempo no te he dicho lo suficiente que eres una trabajadora excelente te lo repito ahora. No hay nadie que me inspire más confianza que tú. Más allá de todo lo que me has aportado en lo laboral, me gustaría decirte el gran apoyo que has supuesto para mí. Reconozco que me ha costado abrirme, pero cuando lo he hecho he descubierto que tienes un corazón enorme y que eres una persona muy atenta y cercana, pero sin empalagar. Ha sido un auténtico privilegio poder contar contigo, con tus consejos y con tu apoyo. Muchas gracias por escucharme, aunque me haya repetido hasta la saciedad. Gracias también por las bromas y las risas. Las he necesitado mucho en mis épocas más bajas y creo que tú te has dado cuenta y has estado ahí para sacarme a flote. Uno de los grandes recuerdos que me llevo de ti son tus miradas, ¡cómo se puede decir tanto con tan poco! Sé que en futuro me seguirán sacando una sonrisa, igual que ahora. Me siento muy afortunada por el tiempo que hemos compartido. Te voy a echar de menos.

Ángeles, tú has sido otro de mis mayores apoyos dentro del laboratorio. En poco tiempo te has convertido en una persona muy querida, y no es de extrañar. Eres dulce, agradable, cariñosa, atenta, generosa… en definitiva, un amor. A pesar de tus propias preocupaciones, siempre has sacado tiempo para escucharme. Quiero darte las gracias por animarme, por hacerme ver el lado positivo de las cosas y sobre todo, por darme siempre confianza en mí misma. Saber que ibas a estar ahí me ha dado fuerzas para avanzar. Ha sido un verdadero placer tenerte a mi lado. Te voy a echar mucho en falta.

Ángela, a ti también tengo que darte las gracias por escucharme, pero sobre todo, tengo que agradecerte el gran ambiente de trabajo que has creado. Los temas de conversación variados, la vitalidad de tu voz, tu carácter extrovertido, las noticias frescas que nos traías… todo ello ha creado un ambiente divertido y relajado en el laboratorio, aunque también Carmen tiene su mérito. Gracias por tu energía y positivismo, me han animado día a día. Tu falta se ha notado mucho. Has dejado un vacío enorme que no hemos sido capaces de llenar, porque eres única. Me llevo un magnífico recuerdo de ti.

Otras maravillosas compañeras a las que tengo mucho que agradecer son Rosario y Laura. Desde el principio me hicisteis sentir como una más, siempre con una palabra amable y dispuestas a ayudarme en lo que necesitara. Laura, gracias por ejercer de protectora , siempre he podido contar contigo. Rosario, gracias por tu maravilloso sentido del humor, los momentos divertidos que has creado no tienen precio. Teneros como compañeras ha sido una suerte y un privilegio, tanto en lo laboral como en lo personal. Habéis sido un gran apoyo para mí. Nerea, si algo tengo que agradecerte es el cariño y la confianza con los que me has tratado desde el principio. Sonia, gracias por todo el ánimo que me has dado. Fran, gracias por tu paciencia a la hora de explicar. Gracias también a Bartosz, nuestra incorporación más reciente, por tu amabilidad y tu compañía.

Quiero agradecerle a Antonio, director de esta tesis doctoral, la oportunidad de poder incorporarme al grupo. También quiero darle las gracias por conseguir la financiación necesaria para cubrir toda esta etapa. Gracias por todo el tiempo invertido en mi formación, por inculcarme una actitud crítica con mi trabajo y por enseñarme que la ciencia debe ser honesta y rigurosa.

Gracias también al servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago por su gran trabajo y a todos los pacientes y voluntarios por su participación, sin ellos este trabajo no habría sido posible.

Mis siguientes palabras de agradecimiento son para Tamara. Me has acompañado desde el principio, ya en el máster, apoyándome en todo momento. En poco tiempo te has convertido en una gran amiga con la que he podido desahogarme con total confianza. A pesar de la distancia, has estado presente en mi vida en los momentos más importantes. Gracias también por todos los momentos divertidos, las noches de fiesta, los bailes, los viajes, las visitas… Te quiero un montón Tamara! Eloi, a ti quiero darte las gracias por el gran regalo que me has dado. De no ser por ti (y por Tamara) mi vida no sería tan maravillosa. Quiero darte las gracias por contar siempre conmigo para tus planes, aunque no te haya acompañado en todos. Gracias también por sacar tiempo incluso cuando no lo tienes para escucharme. Me considero muy afortunada por contar con tu amistad. También gracias a Alana y a Clara por los buenos momentos que hemos compartido. Sois increíbles.

Fuera del ámbito laboral están mis amigas Rebeca, Yhovanna y Ainara. Os he tenido lejos todo este tiempo, pero os he sentido cerca. Gracias por la seguridad con la que me habéis repetido que yo era capaz de sacar este trabajo adelante, al final así ha sido. Os doy las gracias por vuestro enorme cariño y apoyo. También tengo que agradecer que siempre os adaptéis para poder estar conmigo, sé que no es fácil. Aunque nos hemos visto en contadas ocasiones, habéis hecho que sean inolvidables. Estar con vosotras es tener la sensación de estar en casa. Estoy deseando volver a veros, ojalá sea pronto. ¡¡¡OS QUIERO MUCHÍSIMO!!!

Por supuesto, tengo mucho que agradecer a mi familia. A mis padres por todo el esfuerzo y sacrificio que han tenido que hacer durante años para que pudiera formarme. Nunca me ha faltado su cariño ni su confianza. Gracias por ser el pilar sobre el que puedo apoyarme. También he contado con el apoyo y el cariño de mi hermano. A ti quiero agradecerte especialmente todos los buenos momentos de risas y de bromas que me han animado y me han ayudado a desconectar. Y gracias también por la paliza de viaje que tuviste que pasar cuando empezó todo esto, no se me olvida. Gracias también a ti Maribel por todo lo que te

preocupas por mí y por todo el cariño que me das. Siempre pendiente de mí por si necesitaba algo, siempre escuchando y dando ánimos, siempre dispuesta a ayudar en lo que sea. Eres como una segunda madre para mí. Estoy deseando poder celebrar con vosotros este logro.

Adrián, tú sin duda alguna has sufrido la parte más dura y amarga de esta etapa y tengo que agradecerte todo el empeño que pones día a día por animarme. De no ser por ti, esto habría sido demasiado duro. Muchas gracias por la infinita paciencia que has tenido conmigo, a veces soportar mi carácter es complicado, lo sé, hay momentos en los que ni yo me aguanto. Sobre todo cuando me repito una y otra vez con lo mismo. Gracias por reforzar mi confianza, por subirme la autoestima y por creer en mí, me ha hecho falta. Quiero agradecerte también todo lo que me haces reír con tus ocurrencias, tus pullitas de broma y tus dobles sentidos. Estar contigo me hace realmente feliz y al final eso es lo más importante. Sé que estas palabras no reflejan todo lo que tengo que agradecerte, pero creo que tú ya sabes lo importante que eres para mí. Gracias por querer compartir tu vida conmigo.

Muchas gracias a todos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad muy compleja y heterogénea que a pesar de una investigación intensa sigue presentando muchas incógnitas. Aquí, se ha tratado de resolver algunas de las preguntas pendientes en relación con los autoanticuerpos, en particular los autoanticuerpos que no se analizan en la clínica diaria y que no están bien caracterizados por lo que se pueden denominar atípicos. Estos anticuerpos atípicos siempre se estudian comparados y relacionados con los anticuerpos típicos de la AR: el factor reumatoide y los anticuerpos anti-CCP. Esto es así porque los dos tipos de anticuerpos están muy bien establecidos en la clínica como biomarcadores y se conoce bien su evolución y relación con la patogenia de la AR. El test que ha mostrado más valor tanto como biomarcador como en la comprensión de la enfermedad ha sido el de anticuerpos anti-CCP. Este ensayo contiene una veintena de péptidos intentando cubrir todo el repertorio de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas específicos de la AR. El descubrimiento de estos anticuerpos fue el origen de la idea de que las modificaciones postraduccionales de las proteínas podían ser autoantígenos específicamente en los pacientes con AR. Una hipótesis que se ha confirmado al demostrar de forma consistente que hay otros anticuerpos como los dirigidos a las proteínas carbamiladas o los péptidos acetilados que están presentes en una fracción significativa de pacientes con AR y son específicos de la enfermedad. Sin embargo, quedan dudas sin resolver en relación con las proteínas citrulinadas, la utilidad de los anticuerpos anti-péptidos acetilados y la extensión de las modificaciones postraduccionales que son autoantígenos específicos de la AR. En este proyecto hemos tratado de responder a las cuestiones anteriores para determinar la relevancia de la histona H4 citrulinada como antígeno de los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas, conocer la utilidad de los anticuerpos anti-péptidos acetilados para clasificar pacientes con artritis de reciente comienzo como AR y definir mejor los anticuerpos atípicos frente a modificaciones postraduccionales con relevancia en la AR.

La primera duda, referida a la naturaleza de las proteínas citrulinadas, está sin resolver pues aunque hay indicios que señalan a varias proteínas citrulinadas como dianas no se conoce ni su repertorio, ni su importancia relativa. Por ello, hemos analizado un nuevo autoantígeno citrulinado propuesto con características muy llamativas, buscando los anticuerpos que reconocen un péptido citrulinado derivado de la histona H4 (anti-cH4/39-40). Hemos observado una prevalencia superior a la de los anticuerpos dirigidos frente a otras especificidades finas citrulinadas. Con este resultado confirmamos la inmunodominancia de los anticuerpos anti-cH4/39-40 en el repertorio total de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas, aunque no hasta el extremo de que los anticuerpos anti-cH4/39-40 y los anti-CCP sean reactividades equivalentes. También hemos encontrado una asociación significativa de los anticuerpos anti-cH4/39-40 con las erosiones independiente de los anticuerpos anti-CCP y con el alelo de riesgo de *PTPN22*, por lo que es posible que los anticuerpos anti-cH4/39-40 tengan una relación independiente con la patogenia y la etiología de la AR.

Otra cuestión analizada es la utilidad de los anticuerpos anti-péptidos acetilados para clasificar a los pacientes como AR, ya que existen evidencias tanto a favor como en contra. Nuestra contribución ha consistido en evaluar los anticuerpos anti-péptidos acetilados (AAPA), concretamente los que reconocen la lisina (anti-AcLys) y la ornitina (anti-AcOrn) acetiladas, en un estudio longitudinal de 1062 pacientes con artritis de reciente comienzo del Hospital Universitario La Paz y del Hospital Universitario La Princesa, ambos en Madrid, y que fueron seguidos durante dos años. Los resultados muestran que los dos AAPA presentan

un valor inferior al del FR y los ACPA en la clasificación de los pacientes como AR. Además, la inclusión individual de los AAPA en los criterios ACR/EULAR 2010 no mejora la clasificación. En cambio, tras considerar la triple positividad para los anticuerpos anti-AcOrn, el FR y los ACPA hemos observado una mejoría en la clasificación incluso mayor que la que se obtiene con la triple concordancia considerando los anticuerpos anti-CarP. Esta es la primera evidencia convincente de que los anticuerpos anti-AcOrn presentan valor como biomarcador cuando se consideran en concordancia con FR y ACPA, resultado que refuerza la idea de incluir la triple positividad en los criterios de clasificación.

Otra parte del estudio ha buscado definir el repertorio de anticuerpos atípicos frente a modificaciones postraduccionales. En esta cuestión hemos diferenciado por un lado los anticuerpos frente a aductos de malondialdehído-acetaldehído (anti-MAA) o de malondialdehído (anti-MDA), y por otro los anticuerpos anti-proteínas carboniladas, anti-proteínas nitradas y anti-proteínas homocisteiniladas. En relación con los primeros, hemos detectado la presencia de anticuerpos anti-MAA y anti-MDA de diferentes isotipos en los pacientes con AR. Sin embargo, no hemos observado la extraordinaria sensibilidad que se había descrito en dos de los trabajos previos para el conjunto de los pacientes y, especialmente, en los pacientes seronegativos, sin FR y sin ACPA. Este resultado, sumado a su falta de especificidad por la AR, cuestiona la utilidad de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA como biomarcadores diagnósticos. Nuestros resultados también mostraron la primera evidencia de la independencia en estado y en niveles entre estos dos tipos de anticuerpos obtenida de su evaluación en los mismos pacientes. En cuanto al segundo grupo de anticuerpos analizados, solo hemos detectado reactividad específica frente a colágeno tipo II modificado con ribosa, uno de los dos tipos de anticuerpos anti-proteínas carboniladas analizados. Como la reactividad detectada fue muy baja y los análisis para anticuerpos anti-colágeno II carbonilado con ácido hipocloroso, anti-proteínas nitradas y anti-proteínas homocisteiniladas no han detectado reactividad específica en nuestros pacientes con AR, concluimos que estas modificaciones postraduccionales no se pueden considerar como autoantígenos en la AR.

Conjuntamente, los hallazgos de este proyecto refuerzan la relevancia de las histonas como autoantígenos citrulinados en la AR, identifican a los anticuerpos anti-AcOrn como los AAPA con mayor utilidad como biomarcadores para la clasificación de pacientes, muestran que los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA son dos sistemas de anticuerpos independientes que carecen de utilidad como biomarcadores, y contribuyen a definir mejor el patrón de anticuerpos frente a modificaciones postraduccionales que son relevantes en la AR, entre los que no se encuentran los anticuerpos anti-proteínas carboniladas, anti-proteínas nitradas y anti-proteínas homocisteiniladas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS 1
INTRODUCCIÓN 7
1. LA ARTRITIS REUMATOIDE.QUÉ ES 9
2. ETIOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE 11
2.1. FACTORES GENÉTICOS 11
2.1.1. HLA 11
2.1.2. *PTPN22* 13
2.2. FACTORES AMBIENTALES 13
2.2.1. TABACO 13
2.2.2. MUCOSAS 14
3. PAPEL PATOGÉNICO DE LOS AUTOANTICUERPOS EN LA AR 16
3.1. AUTOINMUNIDAD HUMORAL EN LA ETAPA ASINTOMÁTICA DE LA AR 16
3.2. PROGRESIÓN RADIOLÓGICA 18
4. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN 19
5. BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO 23
6. SISTEMAS DE AUTOANTICUERPOS EN LA AR 25
6.1. FACTOR REUMATOIDE 27
6.2. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CITRULINADAS 27
6.3. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS 28
6.4. ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS ACETILADOS 28
6.5. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO-ACETALDEHÍDO 30
6.6. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO 32
6.7. ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CARBONILADAS 32
6.8. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS NITRADAS 33
6.9. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS 34
OBJETIVOS 37
MATERIAL Y MÉTODOS 41
1. MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES 43
1.1. PACIENTES CON ARTRITIS DE RECIENTE COMIENZO 43
1.2. PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA ESTUDIADOS TRANSVERSALMENTE 43

1.3. Pacientes con artritis reumatoide establecida 43
1.4. Controles 44
2. CONSIDERACIONES ÉTICAS 44
3. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS MODIFICADOS POSTRADUCCIONALMENTE 45
3.1. Síntesis de péptidos citrulinados y nativos 46
3.2. Obtención de péptidos acetilados 46
3.3. Generación de aductos oxidados con malondialdehído 47
3.4. Generación de especies carboniladas de colágeno tipo II 48
3.5. Generación de proteínas nitradas 49
3.6. Síntesis de péptidos nitrados y nativos 49
3.7. Generación de proteínas homocisteiniladas 51
4. VERIFICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS 51
4.1. Verificación de los péptidos sintetizados 53
4.2. Verificación de la aducción con malondialdehído y acetaldehído 53
4.3. Comprobación de la carbonilación con HOCl y ribosa 55
4.4. Verificación de la nitración con peroxinitrito de sodio 56
4.5. Evaluación de la homocisteinilación con hidrocloruro de L-homocisteína tiolactona 57
5. DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS CLÁSICOS DE LA AR: FACTOR REUMATOIDE Y ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS 58
6. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A NUEVAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES 58
6.1. Anticuerpos frente a proteínas carbamiladas 61
6.2. Anticuerpos frente a antígenos citrulinados específicos 61
6.3. Anticuerpos frente a péptidos acetilados 62
6.4. Anticuerpos frente a aductos de malondialdehído-acetaldehído 62
6.5. Anticuerpos frente a aductos de malondialdehído 63
6.6. Anticuerpos frente a especies carboniladas de colágeno tipo II 63
6.7. Anticuerpos frente a proteínas nitradas 63
6.8. Anticuerpos frente a péptidos nitrados 64
6.9. Anticuerpos frente a proteínas homocisteiniladas 64
7. GENOTIPADO 64
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 65

8.1. Análisis descriptivo 65
8.2. Análisis de componentes principales 65
8.3. Análisis de regresión 66
8.4. Análisis del rendimiento diagnóstico 67
8.5. Análisis de la mortalidad de los controles sanos 67
RESULTADOS 71
CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LA PROPUESTA INMUNODOMINANCIA DE UN PÉPTIDO CITRULINADO DE LA HISTONA H4 EN LOS PACIENTES CON AR QUE TIENEN ANTICUERPOS ANTI-CCP 73
1.1. Anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas en pacientes con AR y controles 75
1.2. Relación entre los autoanticuerpos anti-cH4/39-40 y otros anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas 76
1.3. Relación de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados con características de la AR 80
CAPÍTULO 2. POTENCIAL PARA UNA MEJOR CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EA CON LOS ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS ACETILADOS 85
2.1. Prevalencia de los anticuerpos anti-péptidos acetilados en los pacientes con EA 87
2.2. Relación entre los autoanticuerpos 92
2.3. Parámetros diagnósticos de los AAPA 93
2.4. Mejora de la clasificación serológica basada en la concordancia de anticuerpos 96
2.5. Mejora de la clasificación de la AR con los anticuerpos anti-AcOrn 97
CAPÍTULO 3. PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS OXIDADOS CON MALONDIALDEHÍDO EN EL SUERO DE PACIENTES CON AR ESTABLECIDA 101
3.1. Verificación de la formación de aductos de MAA 103
3.2. Anticuerpos anti-MAA en pacientes con AR y controles 105
3.3. Anticuerpos anti-MAA derivados de dos preparaciones diferentes 109
3.4. Anticuerpos anti-MDA en pacientes con AR y controles 110
3.5. Relación entre los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA 113
3.6. Relación de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA con las características clínicas y serológicas 116
CAPÍTULO 4. PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CARBONILADAS, NITRADAS Y HOMOCISTEINILADAS EN PACIENTES CON AR TEMPRANA Y ESTABLECIDA 119

4.1. VERIFICACIÓN DE LA CARBONILACIÓN DE CII Y BSA 121
4.2. VERIFICACIÓN DE LA NITRACIÓN 123
4.3. VERIFICACIÓN DE LA HOMOCISTEINILACIÓN 125
4.4. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CII CARBONILADO EN PACIENTES CON AR TEMPRANA 125
4.5. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS/PÉPTIDOS NITRADOS EN PACIENTES CON AR ESTABLECIDA 128
4.6. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS EN PACIENTES CON AR ESTABLECIDA 130
4.7. RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CII CARBONILADO CON EL TRATAMIENTO 132
DISCUSIÓN 135
1. LOS ANTICUERPOS ANTI-cH4/39-40 MUESTRAN ELEVADA CONCORDANCIA CON EL ENSAYO DE ANTI-CCP2 PERO NO SUFICIENTE COMO PARA EXPLICARLO O REEMPLAZARLO 139
2. VALOR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-AcOrn PARA MEJORAR LA CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EA 145
3. POTENCIAL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS PROTEICOS DERIVADOS DE LA OXIDACIÓN CON MALONDIALDEHÍDO EN EL ESTUDIO DE LOS PACIENTES CON AR 149
4. RELEVANCIA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS CARBONILADOS, NITRADOS Y HOMOCISTEINILADOS EN PACIENTES CON AR 155
CONCLUSIONES 167
BIBLIOGRAFÍA 171
ANEXOS 199

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

^{1}H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
3-NT	3-nitrotirosina
3-NT-pep	péptidos nitrados
3-NT-PS	proteínas sinoviales nitradas
AAPA	anticuerpos anti-proteínas/péptidos acetilados
Ab	anticuerpo
Abs.máx	absorbancia máxima de medición
ACP	análisis de componentes principales
ACPA	anticuerpos anti-proteínas citrulinadas
ACR	colegio americano de reumatología
AGEs	productos de glicación avanzados
AIC	Criterio de Información de Akaike
AI	artritis indiferenciada
AMPA	anticuerpos frente a proteínas modificadas postraduccionalmente
anti-AcLys	anticuerpos frente a un péptido derivado de la vimentina mutada citrulinada con lisina acetilada
anti-AcOrn	anticuerpos frente a un péptido derivado de la vimentina mutada citrulinada con ornitina acetilada
anti-Carbo	anticuerpos anti-proteínas carboniladas
anti-CarP	anticuerpos anti-proteínas carbamiladas
anti-CCP	anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados
anti-cH4/39-40	anticuerpos frente a un péptido de la histona H4 citrulinado en las posiciones 39 y 40
anti-Hci	anticuerpos anti-proteínas homocisteiniladas
anti-MAA	anticuerpos frente a aductos de malondialdehído-acetaldehído
anti-MDA	anticuerpos frente a aductos de malondialdehído
anti-Nitra	anticuerpos anti-proteínas/péptidos nitrados
AP	fosfatasa alcalina
AR	artritis reumatoide
AUC	área bajo la curva
AUC	área bajo la curva
BCR	receptor de linfocitos B
BSA	albúmina sérica bovina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CaFBS	suero bovino fetal carbamilado
Ccd.	concordancia
CCP	péptidos cíclicos citrulinados
CDAI	índice clínico de actividad de la enfermedad
CEIC	comité ético de investigación clínica
CII	colágeno tipo II
CTR	control
DAS28	índice de actividad de la enfermedad
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DS	desviación estándar
EA	artritis de reciente comienzo
EC	epítopo compartido
EIRA	*epidemiological investigation of rheumatoid arthritis*
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
EULAR	liga europea contra el reumatismo
FAME	fármacos modificadores de la enfermedad
FBS	suero bovino fetal
Fc	fragmento cristalizable
FcγR	receptor Fc gamma
Fr	relación de frentes
FR	factor reumatoide
GLI-CII	colágeno tipo II bovino glicado
HAQ	cuestionario de evaluación de salud
Hci-PS	proteínas sinoviales homocisteiniladas
hexil-MAA	1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldeído
HLA	antígeno leucocitario humano
HLA-DRB1	cadena beta 1 de la molécula HLA-DR
HOCl	ácido hipocloroso
HOCl-CII	colágeno tipo II bovino carbonilado con ácido hipocloroso
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HRP	peroxidasa de rábano
HSA	albúmina sérica humana
IC	inmunocomplejo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IC 95%	intervalo de confianza del 95%
IgA	inmunoglobulina del isotipo A
IgG	inmunoglobulina del isotipo G
IgM	inmunoglobulina del isotipo M
IL-17F	interleuquina 17F
IL-6	interleuquina 6
IQR	rango intercuartílico
L-Hci-tiolactona	hidrocloruro de L-homocisteína tiolactona
LPO	peroxidación lipídica
m/z	relación masa/carga
MAA-HSA	aductos de malondialdehído-acetaldehído de albúmina humana
MCV	vimentina mutada citrulinada
MDA-BSA	aductos de malondialdehído de albúmina bovina
MDS	escalado multidimensional
MPO	mieloperoxidasa
NaOCl	hipoclorito de sodio
$NaONO_2$	Peroxinitrito de sodio
NET	trampas extracelulares de neutrófilos
OCl^-	anión hipoclorito
OD	densidad óptica
OEA	otras artritis de reciente comienzo
OR	*odds ratio*
PAD	peptidil arginina deiminasa
PCR	proteína C reactiva
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEARL	registro de artritis temprana del Hospital Universitario La Princesa
pNPP	p-nitrofenilfosfato
PS	proteínas sinoviales
PTM	modificación postraduccional
PTP	productos de tipo pentosidina
PTPN22	gen de la proteína tirosina fosfatasa 22
ROC	curva operativa del receptor
RV-	razón de verosimilitud negativa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RV+	razón de verosimilitud positiva
SDAI	índice simplificado de actividad de la enfermedad
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SNP	polimorfismo de nucleótido único
TCR	receptor de linfocitos T
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
TMS	Tetrametilsilano
UA	unidades arbitrarias
VAMC	*Veterans Affairs Medical Centers*
VARA	*Veterans Affairs Rheumatoid Arthritis*
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo
VSG	velocidad de sedimentación globular
ε	coeficiente de extinción molar
λ máx.em.	longitud de onda de máxima emisión
λexc	longitud de onda de excitación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. LA ARTRITIS REUMATOIDE.QUÉ ES.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de naturaleza autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones pequeñas de las manos y los pies en las que se produce inflamación o sinovitis persistente con distribución simétrica, hiperplasia sinovial y dolor. En ausencia de una estrategia terapéutica efectiva la enfermedad progresa hacia la destrucción ósea y el daño articular provocando una deformidad sustancial en las articulaciones. Esto conlleva a una discapacidad funcional importante en los pacientes, cuya calidad de vida se ve reducida de forma notable [1]. La principal zona afectada en la AR son las articulaciones pequeñas, principalmente de las manos, los pies y las muñecas, aunque otras articulaciones grandes pueden verse afectadas incluyendo hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos [2]. La afectación de la AR puede extenderse a otros tejidos u órganos además del tejido articular como el corazón, el pulmón, la piel o el sistema nervioso [3]. A este conjunto de manifestaciones clínicas se le denomina manifestaciones extraarticulares y su desarrollo refleja el carácter sistémico de la AR. El daño a nivel sistémico reduce todavía más la calidad de vida de los pacientes debido a que contribuye al aumento de la discapacidad física que provoca la afectación articular.

La prevalencia de la AR es del 0.5 – 1% en la población mundial, aunque ésta varía según la localización geográfica [4]. Además de las diferencias geográficas también existen diferencias en función de los grupos étnicos, como en el caso de poblaciones de Indios Nativos Americanos cuya prevalencia es hasta cinco veces superior que la del resto de individuos residentes en la misma zona [5,6]. Se observan también diferencias en función del sexo. Las mujeres presentan una prevalencia aproximadamente 3 veces mayor en comparación con los hombres [4].

En la AR existe una activación persistente del sistema inmune acompañada de inflamación que es especialmente manifiesta en las articulaciones como sinovitis. Una de las características de la inflamación en la AR es la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH·) cuyas propiedades químicas les confieren una alta reactividad [7]. Estos compuestos pueden reaccionar con otras sustancias presentes en el medio para generar más especies reactivas. Un ejemplo es la formación del ácido hipocloroso (HOCl) a partir del H_2O_2 y el anión cloruro (Cl^-), reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO) [8]. Una situación similar ocurre en la formación del anión peroxinitrito (ONO_2^-), una especie reactiva de nitrógeno (RNS) de toxicidad elevada generada a partir de la reacción del O_2^- y el óxido nítrico (NO) [9]. La producción de ROS a niveles fisiológicos contribuye a la resolución de la inflamación y al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos [7]. Sin embargo, cuando la liberación de ROS es excesiva los niveles de estos compuestos pueden incrementarse hasta tal punto que sobrepasan la capacidad antioxidante de las defensas naturales que son incapaces de eliminar el exceso de especies reactivas. Además, el deterioro de los sistemas antioxidantes también contribuye al aumento de ROS [7]. Este desequilibrio hacia un exceso de moléculas oxidantes se denomina estrés oxidativo y se encuentra estrechamente relacionado con la AR [10]. De hecho, los pacientes con AR presentan niveles superiores de ROS y RNS en el suero y en el líquido sinovial en comparación con los niveles detectados en pacientes con otras enfermedades y en sujetos sanos [11–19]. También presentan un aumento de moléculas que sirven de marcadores indirectos de estrés oxidativo como los grupos carbonilos [19–21]

generados en las proteínas como consecuencia del daño oxidativo producido por la acción de las especies reactivas [22] o el malondialdehído [14,23–25], un aldehído generado en la peroxidación lipídica (LPO) de los ácidos grasos poliinsaturados ampliamente utilizado como marcador indirecto de estrés oxidativo [26]. La mayor disponibilidad de especies reactivas favorece su interacción con las proteínas en las que se generan modificaciones postraduccionales (PTM, Figura 1). Como consecuencia, se altera la integridad estructural y funcional de las proteínas lo que provoca daños en los tejidos. Además, la PTM oxidativa de las proteínas actúa como fuente de neoepítopos, estructuras generadas *de novo* que no están presentes en las proteínas endógenas. Estos neoepítopos pueden ser reconocidos por el sistema inmune provocando la ruptura de la tolerancia y la producción de autoanticuerpos (Figura 1) [27].

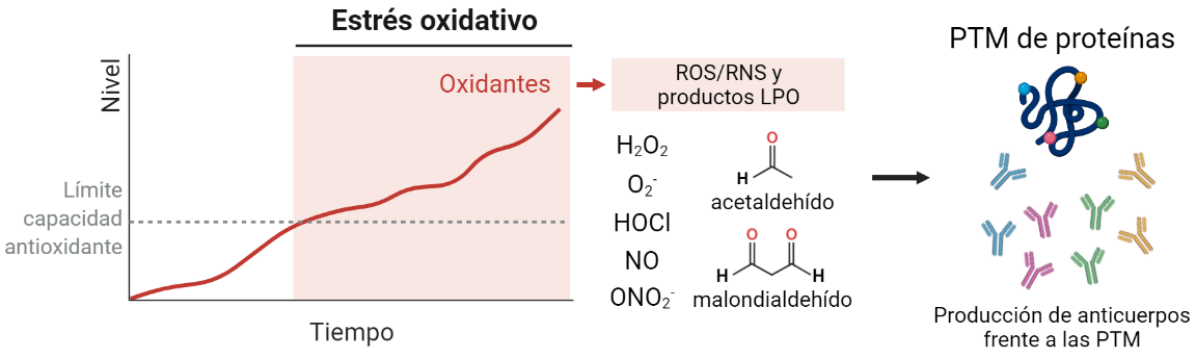


Figura 1. Modificación postraduccional de las proteínas mediada por especies oxidantes. La liberación continuada de especies oxidantes como las ROS/RNS y los productos derivados de la LPO puede llegar a superar la capacidad de las defensas antioxidantes estableciéndose así un estado de estrés oxidativo. En presencia de un exceso de ROS/RNS y de aldehídos reactivos derivados de la LPO se favorece la modificación postraduccional de las proteínas, proceso mediante el cual se generan neoepítopos capaces de desencadenar una respuesta inmune mediada por autoanticuerpos. ROS = especies reactivas de oxígeno, RNS = especies reactivas de nitrógeno, LPO = peroxidación lipídica, MPO = mieloperoxidasa, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, O_2^- = anión superóxido, NO = óxido nítrico, HOCl = ácido hipocloroso, ONO_2^- = anión peroxinitrito, PTM = modificaciones postraduccionales. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Las proteínas que conforman la arquitectura articular son altamente susceptibles de sufrir PTM oxidativas [12,17–19]. Efectivamente, se han detectado proteínas nitradas [28,29], carboniladas [29,30], homocisteiniladas [31] y aductos proteicos [32–34] procedentes del líquido sinovial y de tejido sinovial de pacientes con AR. Además, los neoepítopos presentes en esas proteínas podrían ser capaces de desencadenar una respuesta autoinmune como evidencia la detección de autoanticuerpos frente a esas PTM en algunos estudios [30–39]. Estos hallazgos han llevado a implicar al estrés oxidativo en la patogenia de la AR en la que ejerce un papel como mediador del daño del tejido articular y como promotor de la ruptura de la tolerancia [40].

La presencia de autoanticuerpos es un reflejo de la autoinmunidad en la AR. Destacan principalmente el factor reumatoide (FR) que reconoce la región constante de las inmunoglobulinas G (IgG) [41] y los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA) , una PTM generada en múltiples situaciones incluyendo la sinovitis [42]. La presencia de FR y/o ACPA

define un subgrupo de pacientes denominados seropositivos que presentan un fenotipo más grave de AR en comparación con los pacientes seronegativos que carecen de ambos anticuerpos. Los ACPA y el FR son los dos tipos de anticuerpos más estudiados en relación con la AR y existe una extensa bibliografía con evidencias convincentes de su relevancia en la enfermedad y de su utilidad como biomarcadores, cuestiones que se comentarán más adelante. Además de los ACPA, se han descrito otros sistemas de anticuerpos dirigidos frente a PTM. Algunos han sido muy bien estudiados como los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-CarP) [43]. Otros ya se han confirmado de una forma suficiente pero todavía no se ha definido su lugar en la enfermedad como los anticuerpos anti-péptidos/proteínas acetiladas (AAPA) [44], los anticuerpos frente a aductos de malondialdehído-acetaldehído (anti-MAA) [32], y los anticuerpos frente a aductos de malondialdehído (anti-MDA) [33], mientras que hay un último grupo que se han descrito en algún estudio pero todavía no están suficientemente confirmados como los anticuerpos anti-proteínas carboniladas (anti-Carbo) [37], los anticuerpos anti-proteínas nitradas (anti-Nitra) [35] y los anticuerpos anti-proteínas homocisteiniladas (anti-Hci) [38]. Si todo este repertorio tan amplio de autoanticuerpos se confirma, será un reflejo de la complejidad de la respuesta inmune en la AR. Sin embargo, por el momento se desconocen muchos aspectos, incluyendo la necesidad de confirmar su presencia y la especificidad de su asociación con la AR, y la posible relación con severidad u otras características de la enfermedad. Tampoco conocemos cuáles son los factores etiológicos que predisponen al desarrollo de estos autoanticuerpos atípicos a diferencia de lo que ocurre con los ACPA, para los que se conocen los factores genéticos y ambientales que predisponen a su desarrollo y que se detallarán en el siguiente apartado.

2. ETIOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En la etiología de la AR participan tanto factores genéticos como ambientales, aunque los mecanismos que desencadenan la enfermedad se desconocen por el momento. Es posible que los mecanismos involucrados en la aparición de la AR seropositiva y seronegativa sean diferentes ya que los factores de riesgo genéticos y ambientales que predisponen al desarrollo de la AR seropositiva difieren de los factores que predisponen hacia la forma seronegativa de la enfermedad [45–48]. A continuación se describen los factores de riesgo genéticos y ambientales más importantes que se conocen de la AR.

2.1. FACTORES GENÉTICOS

2.1.1. HLA

La susceptibilidad al desarrollo de la AR está fuertemente influenciada por factores genéticos siendo el más importante el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, *human leukocyte antigen*) o complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II, *major histocompatibility complex*). La asociación más fuerte con la AR se ha observado para las posiciones de aminoácidos 11, 13, 71 y 74 de la cadena β de la molécula HLA-DR (HLA-DRβ1) [49]. El aminoácido que se encuentra en estas posiciones determina si la asociación es de riesgo o de protección frente a la AR y difiere entre la forma seropositiva y seronegativa [49,50]. Dos de esas posiciones, la 71 y la 74, se encuentran dentro del epítopo compartido (EC) que hace referencia a una agrupación de secuencias consenso de aminoácidos en las posiciones

70-74 de la molécula HLA-DRβ1, concretamente QRRAA, RRRAA y QKRAA [51]. Estas secuencias están codificadas por alelos pertenecientes principalmente a los grupos *01 y *04, aunque también están incluidos algunos alelos de los grupos *10 y *14 [51]. En total son 22 los alelos identificados que codifican para las secuencias del EC (Tabla 1). La identificación de los aminoácidos en las posiciones 11, 13, 71 y 74 más asociados con la susceptibilidad a la AR concuerda casi completamente con los alelos que codifican el EC, luego solo supone un refinamiento en la forma de describirla. Estos alelos predisponen específicamente para el desarrollo de la forma ACPA positiva [52–54].

Tabla 1. Alelos *HLA-DRB1* que codifican las secuencias de aminoácidos más comunes en las posiciones 70-74 de la molécula HLA-DRβ1.

	Posición de aminoácidos					Alelos *HLA-DRB1*
	70	**71**	**72**	**73**	**74**	
EC	Q	K	R	A	A	*0401;*0409;*0413;*0416; *0421;*1419;*1421
	Q	R	R	A	A	*0101;*0102;*0105;*0404;*0405;*0408;*0410; *0419; *1402;*1406;*1409;*1413;*1417;*1420
	R	R	R	A	A	*1001
No EC	D	E	R	A	A	*0402;*0414;*0103;*1102;*1116;*1120;*1121;*1301; *1302;*1304;*1308;*1315;*1317; *1319;*1322;*1416
	Q	R	R	A	E	*0403;*0406;*0407;*0417;*0420
	R	R	R	A	E	*09;*1401;*1404;*1405;*1407;*1408;*1410; *1411;*1414;*1418
	D	R	R	A	A	*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
	Q	A	R	A	A	*15;*1309
	Q	K	R	G	R	*03; *0422;*1107

La susceptibilidad hacia la AR no se restringe a los alelos del *HLA-DRB1*, sino que se han identificado alelos en otras moléculas del HLA de clase II y de clase I: del *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-DP* que están asociados con la AR, aunque el efecto de estas asociaciones con la AR ACPA positiva no es tan marcado [49,50]. En el caso de la AR ACPA negativa, el factor genético predominante es el *HLA-B* seguido del *HLA-DP* [50,55].

En relación con el resto de anticuerpos frente a PTM, sólo se ha definido una asociación específica para los anticuerpos anti-CarP con el *HLA-B*, ya que la asociación con el *HLA-DR* no se puede diferenciar de la observada con los ACPA [56]. Los factores de riesgo genéticos que predisponen a la producción de otros anticuerpos frente a PTM relacionados con la AR todavía no se han identificado.

El *HLA-DRB1* es el principal factor genético que predispone a la AR pero por sí solo no explica todo el componente genético que contribuye al desarrollo de la enfermedad [57]. Esta observación ha motivado el estudio de factores genéticos de susceptibilidad adicionales fuera de la región MHC llegando a identificarse más de 100 genes asociados con la AR, aunque con un efecto menor que el de la molécula HLA [58].

2.1.2. *PTPN22*

Entre los factores de riesgo genéticos localizados fuera de la región del MHC que confieren susceptibilidad al desarrollo de la AR destaca el gen *PTPN22*, identificado como el segundo más importante después del *HLA-DRB1*. Concretamente, el polimorfismo de nucleótido único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) rs2476601 de este gen que codifica para la variante R620W de la proteína fosfatasa de tirosina no receptora de tipo 22 (PTPN22) es el más fuertemente asociado con la AR [59], en especial con el fenotipo ACPA positivo y con un efecto menos marcado con el fenotipo ACPA negativo [46,60,61].

La variante R620W presenta una actividad fosfatasa alterada respecto de la proteína nativa, pero mantiene la funcionalidad. Aunque el papel de esta variante en la susceptibilidad de la AR no está completamente definido, las evidencias obtenidas hasta el momento sugieren que podría ejercer su efecto a través de varios mecanismos complementarios [62]. Por un lado, la variante R620W aumentaría la producción de ROS [63] y la NETosis [64], un proceso de muerte celular de los neutrófilos en el que se liberan al medio extracelular enzimas con capacidad para generar PTM [65,66]. Por otro lado, esta variante R620W promovería la expansión del repertorio de células T y B autorreactivas en la periferia al permitir que sobrevivan a los mecanismos de control de la tolerancia [67–69]. Por el momento, los anticuerpos anti-CarP han sido los únicos aparte de los ACPA estudiados en relación con el polimorfismo *PTPN22*, pero no se ha detectado una asociación significativa [70,71].

2.2. FACTORES AMBIENTALES

2.2.1. Tabaco

A la etiología de la AR contribuye un componente ambiental además de un componente genético. El factor ambiental mejor estudiado y más reconocido es el tabaco. Principalmente se asocia con la forma seropositiva de la AR [72,73]. Se ha descrito además una fuerte interacción entre el tabaco y los alelos del EC que potenciaría el riesgo de desarrollar AR ACPA positiva en los pacientes fumadores que también presentan estos alelos [74,75].

La relación del tabaco con la AR seropositiva se ha atribuido específicamente a la presencia de ACPA. Sin embargo, varios trabajos recientes han aportado evidencias convincentes que cuestionan la especificidad de la asociación del tabaco y los ACPA. Los resultados de estos trabajos indican que el tabaco se asocia con la presencia concordante de varios autoanticuerpos, específicamente FR, ACPA y anti-CarP [47,48,76] y que cuando se considera únicamente la positividad para un tipo de anticuerpo el tabaco se asocia con la presencia de FR pero no de ACPA [48,76]. En otras palabras, el tabaco predispone principalmente al desarrollo de la AR caracterizada por la presencia de múltiples autoanticuerpos más que a la AR ACPA positiva. Estos hallazgos se suman al conjunto de evidencias previas [77–82] que ponen en duda el modelo patogénico que relaciona el tabaco con los alelos de riesgo del EC y la producción de ACPA. Este modelo propone que la exposición al humo del tabaco provoca la citrulinación de proteínas que son presentadas en el contexto del EC con la consiguiente ruptura de la tolerancia y producción de ACPA a nivel pulmonar [83].

La citrulinación de proteínas no es la única PTM que puede verse potenciada por el tabaco. La carbamilación de proteínas también está favorecida por el tabaquismo al aumentar la disponibilidad del precursor tiocianato necesario para la reacción [84]. De forma análoga, la carbonilación, la nitración o la aducción de proteínas también pueden verse potenciadas por el efecto del humo del tabaco, ya sea por su alto contenido de compuestos reactivos o por su capacidad para inducir la producción de especies reactivas como HOCl, ONO_2^-, acetaldehído y malondialdehído [84–88]. A pesar de que el tabaco es capaz de potenciar diversas PTM, su relación con la presencia de los anticuerpos que reconocen estas PTM ha sido poco estudiada y cuando lo ha sido no parece estar asociado. Así, los anticuerpos anti-CarP no están asociados con el tabaquismo [70,71]. En el caso de los anticuerpos anti-MAA, se ha observado una asociación entre el isotipo IgM y el tabaquismo pero únicamente en los pacientes que fuman en el momento del estudio [32]. Sin embargo, esta asociación no se replicó en un trabajo posterior realizado por los mismos autores, siendo el isotipo IgA el asociado con el tabaquismo [39]. Por su parte, los anticuerpos anti-Hci no se asociaron con el hábito tabáquico [38], mientras que la relación con la presencia de anticuerpos anti-MDA, anti-Carbo y anti-Nitra no ha sido estudiada por el momento.

2.2.2. Mucosas

Las mucosas han emergido como un nuevo factor etiológico de la AR [89]. La principal evidencia que sugiere que la autoinmunidad en la AR se origina en una localización diferente de las articulaciones es la presencia de ACPA, FR y anticuerpos anti-CarP en el suero de algunos pacientes años antes de que manifiesten síntomas articulares [90,91]. Otras evidencias que apoyan la idea anterior son la identificación del isotipo IgA de ACPA y de FR, el principal isotipo producido en las mucosas [92], en la etapa preclínica de la enfermedad y su asociación con el desarrollo de la AR [90,93,94]. Los estudios se han centrado en las mucosas oral e intestinal en relación con la microbiota, así como en la mucosa de las vías aéreas en relación con el humo del tabaco, el factor ambiental más importante de la enfermedad. Para testar la hipótesis del pulmón como desencadenante de la autoinmunidad en la AR se han realizado estudios en pacientes en riesgo de desarrollar AR o con AR reciente pero sin síntomas de artritis. Los resultados de estos estudios han aportado evidencias que apoyan la hipótesis anterior. Una de ellas es la identificación de anomalías en la estructura pulmonar en

pacientes ACPA y/o FR positivos pero sin artritis similares a las que presentan pacientes con artritis [79]. Otra evidencia a favor es la presencia de niveles detectables de ACPA y FR en el esputo inducido, pero no en el suero y el aumento de los niveles de ACPA en el esputo inducido en comparación con el suero tras normalizar por la cantidad de Ig total [82]. Además, se ha descrito un aumento de los niveles de ACPA en muestras pulmonares respecto de los niveles séricos en pacientes con AR de reciente comienzo [80]. Estos resultados sugieren que la producción de ACPA se inicia en el pulmón en la fase preclínica de la AR y que persiste durante la evolución de la enfermedad.

Como ya se ha comentado, la exposición al tabaco puede potenciar la generación de diversas PTM sobre las proteínas pulmonares más allá de la citrulinación [95]. La presencia de aductos de MAA en muestras pulmonares de pacientes con AR concuerda con una posible producción de anticuerpos anti-MAA a nivel pulmonar [96]. A pesar de las evidencias a favor del pulmón como origen de la producción de ACPA en la AR, también existen evidencias en contra. No todos los pacientes que desarrollan AR ACPA positiva presentan alteraciones en los pulmones o niveles detectables de ACPA o FR en fluidos de muestras pulmonares ni tienen un historial de exposición al tabaco [79,80,82]. Estos resultados cuestionan el modelo patogénico del pulmón como origen de la autoinmunidad en la AR y sugieren que la ruptura de la tolerancia podría producirse en otras localizaciones.

La mucosa oral también se ha estudiado en relación con la etiología de la AR. Al igual que se ha comentado para el pulmón, las encías están en contacto directo con el humo del tabaco que provoca la inflamación del tejido. Sin embargo, el énfasis se ha situado en la relación entre periodontitis y AR ya que hay evidencias epidemiológicas de la asociación entre las dos enfermedades que, además, comparten factores de riesgo [97–100]. También se ha observado una asociación entre la presencia de periodontitis y ACPA [101–103]. Esta asociación se ha hipotetizado que estaría relacionada con que dos de las bacterias implicadas en la patogénesis de la periodontitis, concretamente *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), son capaces de promover la citrulinación de proteínas en las encías [104,105]. Esta generación de autoantígenos citrulinados podría desencadenar la producción de ACPA en la mucosa oral dando lugar al inicio de la autoinmunidad en la AR [106]. La citrulinación no es la única PTM que se encuentra aumentada en los pacientes con periodontitis, sino que también se ha detectado un aumento de proteínas carbamiladas y modificadas con MAA en comparación con las encías de sujetos sanos [107,108]. La presencia de estas tres PTM en las encías de los pacientes con periodontitis concuerda con el aumento de la NETosis detectado en el mismo tejido [65,109], proceso que es capaz de promover la generación de diferentes PTM como ya se ha comentado. Aunque estas evidencias sugieren que la autoinmunidad en la AR podría originarse en las encías como consecuencia de la periodontitis, los resultados de los trabajos que han evaluado la relación entre estas dos enfermedades son inconsistentes con datos tanto a favor como en contra [110] y no permiten sacar ninguna conclusión.

La mucosa intestinal también se ha propuesto como origen de la autoinmunidad en la AR. Esta hipótesis surge de la alteración del equilibrio de la flora intestinal (disbiosis) detectado en los pacientes con AR en comparación con sujetos control [111–113]. La causa de este desequilibrio se ha atribuido tanto a un aumento de la población de bacterias potencialmente patogénicas[114] como a una disminución de la población de bacterias beneficiosas [115], aunque las bacterias implicadas en la disbiosis difieren entre estudios. Por el momento, las evidencias

que implican a la mucosa intestinal en la etiología de la AR son indirectas o poco concluyentes [89], por lo que son necesarios más estudios que clarifiquen el papel del microbioma intestinal en el desarrollo de la autoinmunidad en la AR. Además, ninguno de los estudios ha relacionado la disbiosis intestinal con la producción de autoanticuerpos.

La implicación de las mucosas en la etiología de la AR todavía no se ha definido con claridad. Entre las muchas posibilidades se incluyen el efecto de las mucosas en la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T, la posibilidad de mimetismo molecular entre las bacterias y autoantígenos y otras relacionadas con metabolitos bacterianos y el sistema inmune innato [116,117]. Pero también es posible que los factores ambientales como el tabaco o la presencia de bacterias patogénicas provoquen la inflamación del tejido pulmonar, oral e intestinal y que como resultado se generen PTM que son reconocidas por el sistema inmune de sujetos susceptibles iniciando la fase autoinmune de la AR. Sin embargo, todavía son muchas las incógnitas que quedan por aclarar como cuál es la localización en la que se desencadena la producción de autoanticuerpos en la AR y cuáles son los mecanismos responsables de dirigir la respuesta inmune a las articulaciones.

3. PAPEL PATOGÉNICO DE LOS AUTOANTICUERPOS EN LA AR

La presencia de autoanticuerpos no es suficiente para demostrar que tienen una participación importante en la patogenia de la AR. Además, los autoanticuerpos no son necesarios en todos los pacientes, pues hay una fracción de pacientes que no tienen anticuerpos y que, individualmente, son indistinguibles desde el punto de vista clínico de los que los tienen. Sin embargo, hay evidencias que indican que los autoanticuerpos podrían estar implicados. Su presencia en las fases iniciales de la AR en las que todavía no existe inflamación articular se interpreta a favor de su papel patogénico. Además, las asociaciones descritas para el FR y los ACPA con el daño radiológico y el descubrimiento de los mecanismos subyacentes refuerzan la idea de que los autoanticuerpos intervienen activamente en la patogenia de la AR. En las siguientes secciones se describen con más detalle estos hallazgos.

3.1. AUTOINMUNIDAD HUMORAL EN LA ETAPA ASINTOMÁTICA DE LA AR

La AR es una enfermedad con una evolución altamente heterogénea que puede progresar de forma lenta desde una etapa preclínica asintomática hacia una sintomática sin presencia de artritis clínicamente detectable y finalmente a una etapa clínica en la que ya se ha desarrollado artritis. Cada una de estas fases del desarrollo de la AR se definen empleando la terminología establecida por la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) para obtener grupos homogéneos de pacientes y así facilitar la reproducibilidad y la comparación de los resultados entre estudios [118]. En total se han definido 5 fases: factores de riesgo genéticos y ambientales, autoinmunidad sistémica asociada con la AR, síntomas en ausencia de artritis clínica, artritis no clasificable y finalmente AR (Figura 2). El primer término hace referencia a la fase en la que los sujetos presentan una susceptibilidad a desarrollar AR debido a la presencia de factores de riesgo genéticos y ambientales. Posteriormente, aparece la autoinmunidad

sistémica asociada con la AR en la que los individuos presentan autoanticuerpos pero sin signos ni síntomas articulares [119]. En la siguiente fase aparecen los primeros síntomas que pueden consistir únicamente en artralgia, pero no se observa inflamación articular clínicamente detectable [120]. A pesar de que no hay evidencia de artritis, en esta etapa puede producirse la infiltración de células inmunes inflamatorias en la sinovia [121]. A continuación, aparecen las primeras manifestaciones clínicas de artritis en los pacientes. Durante el primer año de evolución desde la aparición de artritis se habla de pacientes con artritis de reciente comienzo (EA) [122–125], aunque en algunos estudios el tiempo de evolución de los pacientes considerados como EA se amplía hasta los 2 años [126,127]. Si los pacientes cumplen los criterios de clasificación de la AR [128] se les denomina como AR temprana para distinguirlos de los que ya tienen una AR establecida. La AR temprana identifica pacientes con un tiempo de evolución menor de 6 meses según la definición propuesta por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) [129], aunque algunos trabajos incluyen pacientes definidos como AR temprana que presentan tiempos de evolución de hasta 2 años [37,130].

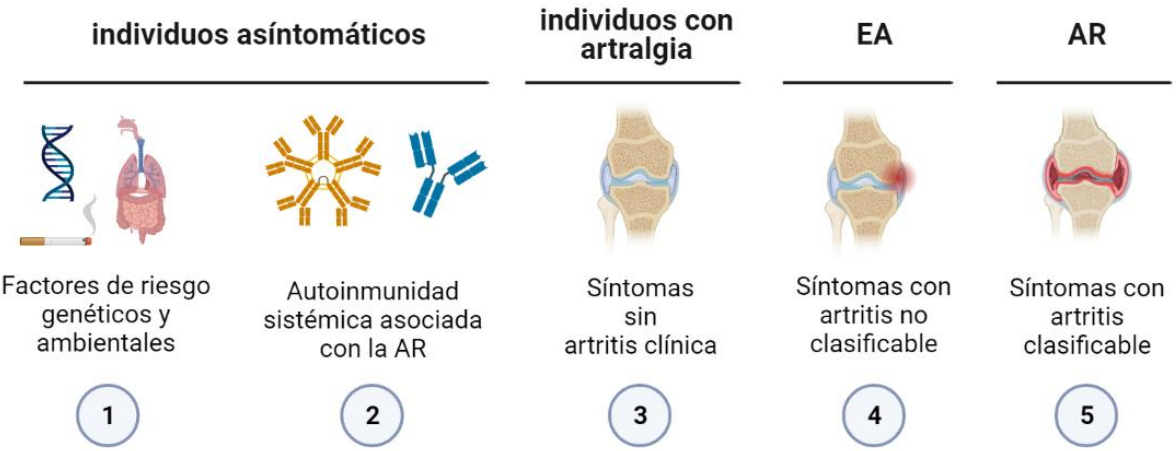


Figura 2. Fases del desarrollo de la AR. La imagen representa las 5 fases de la evolución hacia AR nombradas según la terminología recomendada por el EULAR junto con los factores de riesgo de desarrollar AR asociados y los sujetos que se encuentran en cada fase. El riesgo de AR en la primera fase lo confieren factores genéticos y ambientales como el *HLA*, *PTPN22*, el tabaco o la disbiosis en las mucosas. En la segunda fase, la presencia de los autoanticuerpos FR y ACPA refleja el inicio de la autoinmunidad sistémica. Los individuos que se encuentran en estas fases son asintomáticos. La tercera fase se define por la presencia de síntomas en ausencia de artritis clínica: artralgia con dolor articular. La cuarta fase empieza con el inicio de la artritis. Mientras no es posible la clasificación de los pacientes se habla de pacientes con EA. La quinta fase se corresponde con pacientes que ya cumplen los criterios clasificación como AR. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Los pacientes con EA forman un grupo heterogéneo y solo una fracción están en una de las fases de la AR. Por ello, estos pacientes presentan una evolución muy variable. En el caso más favorable la inflamación puede resolverse de forma espontánea. Otra posibilidad es que la inflamación persista pero sin que los pacientes cumplan los criterios de clasificación establecidos para una forma específica de artritis, en cuyo caso se dice que presentan una artritis indiferenciada (AI). Finalmente, los pacientes pueden evolucionar hacia una enfermedad más definida como la AR [131,132] para la que se han desarrollado criterios de

clasificación específicos. Identificar qué pacientes con EA desarrollarán en el futuro AR es complicado. Por un lado los síntomas clínicos que presentan los pacientes con EA no son específicos de la AR, sino que se comparten con otras enfermedades inflamatorias [1]. Por otro lado, la falta de pruebas diagnósticas supone una dificultad añadida [133]. También hay que tener en cuenta que no todos los individuos que finalmente desarrollan AR siguen el esquema de fases definido por el EULAR (Figura 2) [118]. Este escenario tan complejo hace necesaria la identificación de biomarcadores en las fases iniciales de la AR que permitan predecir qué pacientes van a desarrollar AR con el tiempo.

Los anticuerpos, en concreto el FR, los ACPA y los anti-CarP, son excelentes candidatos para su uso como biomarcadores dado que los tres se encuentran presentes en las fases iniciales de la AR. Se han encontrado tanto en sujetos asintomáticos hasta una década antes la aparición de los primeros síntomas clínicos [90,94,119,134–137], como en pacientes con artralgia [90,136–139] y en pacientes con EA [140–142]. Otra característica que comparten el FR, los ACPA y los anticuerpos anti-CarP y que justifica su uso como biomarcadores es el aumento que experimentan sus niveles a medida que se progresa hacia la AR, un aumento que se ve intensificado dos años antes del inicio de la artritis [90,94,119,136]. Durante la evolución hacia la AR se produce además la propagación de epítopos de los ACPA, es decir, se expande el patrón de proteínas citrulinadas que pueden reconocer estos anticuerpos, mostrando una expansión más marcada de forma paralela al incremento de los títulos [91,143–145]. Por lo tanto, estos anticuerpos se consideran factores de riesgo asociados a la AR de forma que los sujetos que presentan estos anticuerpos tienen un riesgo mayor de desarrollar AR en comparación con los individuos que carecen de ambos anticuerpos [118] (Figura 2).

Otros anticuerpos además del FR, los ACPA y los anti-CarP están presentes en las etapas previas al desarrollo de la AR, como los AAPA que se detectan en pacientes con EA [44] o los anticuerpos anti-MAA presentes en sujetos asintomáticos que posteriormente desarrollan AR [146]. La presencia de estos anticuerpos frente a PTM en las fases iniciales de la AR indica que podrían ser de utilidad para identificar pacientes que van a evolucionar hacia AR. Sin embargo, todavía es necesario confirmar la relación de los nuevos anticuerpos con la AR con estudios independientes.

3.2. PROGRESIÓN RADIOLÓGICA

Los pacientes con AR desarrollan daño articular y óseo de forma progresiva con consecuencias cada vez más graves a medida que avanza la enfermedad y de forma más marcada si no se administra tratamiento. El daño articular conlleva la aparición de dolor, pérdida ósea, deformidades en las articulaciones y finalmente provoca un alto grado de incapacidad física que afecta negativamente a la calidad de vida de los pacientes [147]. La pérdida ósea en la AR es localizada y generalizada. La pérdida local de hueso a nivel articular se denomina erosión ósea y se produce de forma preferente en los sitios de contacto directo del hueso con la sinovia inflamada. Por su parte, la pérdida de hueso generalizada resulta en una pérdida a nivel sistémico de densidad mineral ósea (DMO), lo que aumenta el riesgo de fracturas y de osteoporosis [148].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la sinovia inflamada se expresan diversos mediadores inflamatorios que alteran la homeostasis del metabolismo óseo favoreciendo por un lado la diferenciación y la activación local de los osteoclastos y por otro la inhibición de los osteoblastos, lo que resulta en un

aumento de la resorción ósea [149–151]. Además de la participación de moléculas inflamatorias, en la pérdida ósea también se han implicado a los autoanticuerpos. Aunque los procesos específicos que inician y perpetúan la destrucción ósea en la AR se desconocen por el momento[149,152], se han propuesto dos posibles vías a través de las cuales los anticuerpos podrían ejercer su función patogénica. En una, los anticuerpos promueven la diferenciación de los precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros al interaccionar con proteínas citrulinadas presentes en la superficie celular a través de la región de reconocimiento antigénico Fab, provocando un aumento de la resorción ósea tanto *in vitro* como *in vivo* [153–155]. En la otra, la diferenciación a osteoclastos se induce tras la interacción de los receptores FcγR expresados en la superficie de múltiples células incluyendo monocitos, que potencian la inflamación, y los precursores de osteoclastos con la región Fc de los anticuerpos que están formando inmunocomplejos (IC) [156].

Las erosiones son el tipo de lesión más estudiada en relación con la AR. Su presencia se asocia con la positividad para el FR y con los ACPA, siendo esta asociación significativamente superior cuando se considera la presencia concordante de ambos anticuerpos respecto de la asociación que se obtiene de considerar cada anticuerpo individualmente [157]. Este hallazgo se ha explicado con una hipótesis que implica el mecanismo de activación de la osteoclastogénesis a través de los receptores para el Fc de las inmunoglobulinas mencionado antes. Las señales de activación son más intensas y duraderas cuando se produce entrecruzamiento de múltiples receptores Fc en la superficie del osteoclasto o del monocito. A su vez, el entrecruzamiento se favorece por la presencia de agregados de IC. Los IC se formarían al unirse los ACPA con sus proteínas diana y se agregan al unirse con el FR, ya que cada molécula de FR que puede reconocer 5 moléculas de IgG. Hay experimentos *in vitro* que apoyan este mecanismo [158]. El FR y los ACPA no solo muestran una asociación con la presencia de erosiones, sino que también muestran una asociación con la progresión hacia una artritis erosiva en estudios longitudinales, aunque aquí el efecto observado para los ACPA es mayor que para el FR [149,152]. La fuerte asociación del FR y los ACPA con el daño óseo y la progresión radiológica es una de las razones de que se consideren biomarcadores de predicción de una peor evolución de la AR y de que se reconozcan así por el EULAR [159].

La relación entre el daño radiológico y los nuevos anticuerpos frente a PTM descritos en la AR ha sido poco estudiada y pretende ampliarse como parte del trabajo de este proyecto.

4. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

La identificación precoz de pacientes con un alto riesgo de desarrollar AR es de vital importancia para su manejo clínico. Sin embargo, clasificar a los pacientes en las etapas más tempranas de su evolución resulta complicado debido a la falta de manifestaciones clínicas discriminatorias y pruebas diagnósticas [1,133]. Precisamente durante estas etapas iniciales en las que se desarrollan los primeros síntomas es donde el tratamiento de los pacientes que finalmente serán clasificados como AR aporta los mayores beneficios [160,161]. La necesidad de identificar pacientes con AR en las fases iniciales para así iniciar el tratamiento lo antes posible y mejorar su pronóstico impulsó la creación de los nuevos criterios de clasificación de la AR en el año 2010 por la ACR y por el EULAR [128]. Estos criterios prescinden de las

características típicas de una enfermedad más establecida, como la presencia de cambios radiográficos, incluidas en el criterio de la ACR de 1987 cuyo objetivo era diferenciar los pacientes con AR de otras enfermedades reumáticas [162].

Los nuevos criterios ACR/EULAR 2010 ponen más énfasis en el diagnóstico precoz e incorporan características presentes en etapas tempranas de la enfermedad atribuyendo más peso a ciertas características sobre otras. Un ejemplo claro es la puntuación asignada a la serología tal y como se muestra en la Tabla 2, en la que se incluyen los autoanticuerpos FR y ACPA. La puntuación recibida difiere en función de los títulos de estos dos anticuerpos [163]. Concretamente, los pacientes con títulos altos de cualquiera de los dos anticuerpos reciben 3 puntos mientras que los pacientes positivos pero con títulos bajos reciben 2 puntos. Para determinar si el título de un anticuerpo es alto o bajo se emplea como umbral el valor de 3 veces el límite superior normal. Los títulos altos están por encima de ese valor mientras que los títulos bajos se consideran aquellos que están por debajo de este umbral pero por encima del límite superior normal que define la positividad [164]. La puntuación asignada a los anticuerpos representa una fracción importante de los 6 puntos totales que se requieren para la clasificación como AR.

Tabla 2. Criterios de clasificación de la AR. A la izquierda se muestran los criterios de clasificación de 1987 y a la derecha los nuevos criterios del 2010. Los reactantes de fase aguda son la proteína C reactiva (PCR) o la velocidad de sedimentación globuar (VSG).

Criterios de Clasificación de la AR

ACR 1987	ACR/EULAR 2010
1. Rigidez matutina: duración ≥ 1 hora antes de observar mejoría	**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
2. Artritis en ≥ 3 articulaciones	
3. Artritis en las articulaciones de la mano	**2. Serología** FR y ACPA negativos: 0 puntos FR y/o ACPA positivos bajos: 2 puntos FR y/o ACPA positivos altos: 3 puntos
4. Artritis simétrica	
Los criterios 1-4 deben presentarse durante ≥ 6 semanas.	**3. Reactantes de fase aguda** PCR o VSG normales: 0 puntos PCR o VSG elevadas: 1 punto
5. Presencia de nódulos reumatoides	
6. FR positivo	**4. Duración de los síntomas** < 6 semanas: 0 puntos ≥ 6 semanas: 1 punto
7. Cambios radiográficos	
AR si ≥ 4 criterios	AR si ≥ 6 puntos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La incorporación de los ACPA a los nuevos criterios de clasificación se debe principalmente a la elevada especificidad que muestran por la AR en comparación con el FR, el único anticuerpo incluido en los criterios de 1987 [162]. Un meta-análisis de 86 estudios mostró una sensibilidad comparable para el FR y los ACPA de 69% y 67% respectivamente, pero una especificidad por la AR superior para los ACPA, 95%, en comparación con la del FR, 85% [165]. Sin embargo, la capacidad diagnóstica real de los marcadores se define en base a su VPP y valor predictivo negativo (VPN) más que por la sensibilidad y especificidad, cuyos valores son altamente dependientes de la población en la que se está estudiando el marcador. El VPP para los ACPA varía entre 84 – 94% mientras que el FR presenta valores ligeramente inferiores entre 74 – 86%, mientras que el VPN es similar para ambos anticuerpos, oscilando entre 64 – 89% para los ACPA y 69 – 88% para el FR [44,141,166,167]. También es interesante comparar el rendimiento de los criterios de clasificación de 1987 y del 2010 en su conjunto. Los cambios introducidos en los criterios del 2010 han disminuido el VPP respecto de los criterios de 1987, aunque su valor en torno al 80% es razonablemente alto. En cambio, el VPN de los criterios del 2010 ha aumentado respecto de los criterios anteriores. A pesar de ese aumento, su valor en torno al 60% indica que todavía queda una fracción considerable de pacientes con AR en sus fases iniciales que no cumplen con los criterios del 2010 [168]. Analizado de otra forma, con los criterios del 2010 se ha conseguido aumentar notablemente la sensibilidad con la que se identifican pacientes con AR (82% *vs.* 71% criterios 1987) a costa de una pérdida de especificidad (61% *vs.* 65% criterios 1987) [168,169]. Por todo ello, se puede concluir que aunque los criterios del 2010 cumplen con el objetivo de identificar pacientes con AR en etapas más tempranas [169], todavía existe margen para mejorar la clasificación de la AR [170–172].

La identificación de nuevos anticuerpos frente a PTM relacionados con la AR es un campo que podría permitir el refinamiento de los criterios de clasificación, especialmente en el subgrupo de pacientes negativos para FR y ACPA. Encontrar biomarcadores de clasificación es especialmente importante en este subgrupo de pacientes seronegativos debido a la dificultad que presentan para cumplir con los criterios de clasificación actuales precisamente por el elevado peso que se le otorgan al FR y a los ACPA (Tabla 2). Como consecuencia, la precisión de los criterios de clasificación actuales en los pacientes seronegativos es mucho menor en comparación con la de los pacientes positivos para FR o ACPA [169–171,173,174] y por lo tanto, es en estos pacientes seronegativos en los que la necesidad de encontrar biomarcadores de diagnóstico es mayor. La inclusión de nuevos anticuerpos frente a PTM permitiría cubrir la necesidad de biomarcadores en el 15 – 45% de los pacientes que carecen de FR y ACPA [170,175], lo que supondría una mejora de la sensibilidad de los criterios. Sin embargo, aumentar la sensibilidad mediante la inclusión de autoanticuerpos atípicos o nuevos conlleva cierta dificultad debido a la elevada concordancia que presentan con el FR y los ACPA [44,176,177]. En general, la reactividad de los autoanticuerpos atípicos descritos en la AR se confina en el subgrupo de pacientes ACPA positivos [33,44,176], por lo que es poco probable que ayuden a identificar una fracción significativamente mayor de pacientes con AR respecto de la que se consigue empleando el FR y los ACPA, ni en el total de los pacientes ni en los pacientes seronegativos [175]. Efectivamente, los trabajos que han evaluado el uso de los anticuerpos anti-CarP como este tipo de biomarcador muestran una mejora insuficiente en la clasificación global de los pacientes sobre la que se obtiene cuando se tienen en cuenta el FR y los ACPA [44,141]. Además, los anticuerpos anti-CarP tampoco contribuyen a la mejor clasificación de los pacientes seronegativos en estos trabajos [44,141]. Otros anticuerpos que resultan interesantes en este sentido son los AAPA. Estos anticuerpos son los únicos

comparables a los anticuerpos anti-CarP en cuanto a reproducibilidad y características diagnósticas y además presentan un nivel bajo de reactividad cruzada con los anticuerpos anti-CarP y los ACPA [44]. A pesar de que estas características son prometedoras, el valor de los AAPA para la clasificación de la AR no se ha evaluado completamente debido a la alta discordancia detectada en la sensibilidad de estos anticuerpos en los pacientes seronegativos de tres colecciones diferentes. En el trabajo en el que se describen estos anticuerpos por primera vez en la AR observaron una sensibilidad del 13.2% en los pacientes ACPA negativos [44]. En cambio, la prevalencia descrita en dos comunicaciones a congresos fue mucho mayor, del 55% y 41% en los pacientes anti-CCP/FR doble negativos [178,179]. Parte de la diferencia podría explicarse por el uso de diferentes péptidos acetilados para evaluar la presencia de AAPA. Juarez *y col.* [44] emplean un único péptido con lisina acetilada, mientras que para el trabajo mencionado en las comunicaciones se utilizan dos o tres péptidos acetilados, con lisina u ornitina acetiladas y además la acetilación se encuentra en diferentes posiciones en el péptido [178,179]. En vista de la sensibilidad de más del 40% descrita para los AAPA en los pacientes seronegativos en estos dos últimos trabajos, es necesario determinar si estos autoanticuerpos podrían ser de utilidad como biomarcadores para la AR seronegativa. Precisar la sensibilidad de los AAPA en el conjunto de pacientes con AR con especial interés en el subgrupo de pacientes seronegativos y evaluar su potencial uso como biomarcador en base a sus características diagnósticas es uno de los objetivos de este proyecto, cuyos resultados ya se han publicado (Anexo 1) y se recogen en el capítulo 2 de esta tesis. Al igual que se ha descrito para los AAPA, la elevada sensibilidad observada para otros autoanticuerpos en los pacientes ACPA negativos como los anticuerpos anti-MAA [32] o los anticuerpos anti-Carbo [37] indica que podrían contribuir al refinamiento de los criterios actuales mejorando la clasificación de los pacientes seronegativos. Evaluar el uso de los anticuerpos anti-MAA y los anti-MDA como biomarcadores en los pacientes seronegativos es otro de los objetivos de este proyecto.

Alternativamente, la mejora de los criterios de clasificación del 2010 podría enfocarse desde otro punto de vista, el del aumento de la especificidad. Este enfoque es particularmente relevante dada la pérdida de especificidad cuantificada en un 4% que muestran los criterios actuales en relación con los criterios de 1987 [169]. Esta disminución en la especificidad no es para nada despreciable si se tiene en cuenta que los criterios de clasificación han sido desarrollados para definir grupos homogéneos de pacientes para investigación [133] y por lo tanto se requiere de la mayor especificidad posible. Un enfoque que parece permitir un aumento de especificidad se obtiene del trabajo realizado por Verheul *y col.* [180]. Los autores de este trabajo describen un aumento destacado de la especificidad para la identificación de pacientes con AR cuando se evalúa simultáneamente la presencia de FR, ACPA y anticuerpos anti-CarP. La presencia concordante de estos tres anticuerpos llegó a alcanzar especificidades incluso del 100% y mostró una asociación con el desarrollo de AR más fuerte en comparación con cualquier otra combinación de anticuerpos. Este hallazgo apuntó hacia la concordancia de autoanticuerpos como característica relevante en la identificación de pacientes con AR, lo que llevó a investigar si la positividad simultánea para varios autoanticuerpos podría mejorar los criterios de clasificación actuales. Para abordar esta cuestión, nuestro laboratorio empleó la triple positividad para el FR, los ACPA y los anticuerpos anti-CarP para generar un sistema de puntuaciones que reemplazara las puntuaciones del componente serológico de los criterios del 2010 tal y como se describe en el trabajo realizado por Regueiro *y col.* [181]. Este nuevo sistema de puntuaciones atribuyó la mayor puntuación a la presencia concordante de tres autoanticuerpos y fue disminuyendo con el número de anticuerpos concordantes presentes. La

triple concordancia de FR, ACPA y anticuerpos anti-CarP mostró valores de VPP superiores a los obtenidos con el componente serológico de los criterios ACR/EULAR 2010 (96.1% para el nivel triple positivo *vs.* 88.8% para el nivel de 3 puntos). Este incremento en el VPP fue muy superior al comparar el nivel con dos anticuerpos concordantes con el nivel de 2 puntos de los criterios del 2010 (82.3% *vs.* 42.3% respectivamente). Además, la triple presencia de FR, ACPA y anti-CarP mostró una fuerte asociación para el desarrollo de AR (OR = 80.9). Adicionalmente, la combinación del componente no serológico de los criterios ACR/EULAR 2010 con el componente serológico de la concordancia aumentó la especificidad y la exactitud con la que se clasificaron los pacientes con EA incluidos en el estudio respecto del uso del actual criterio serológico sólo con FR y ACPA. Estos resultados se han replicado recientemente en una colección mayor de pacientes con EA de la cohorte LEAC [182], lo que proporciona robustez a los hallazgos. Esta replicación de los resultados también resalta la ventaja del uso de un sistema de puntuación basado en la concordancia de autoanticuerpos, su elevada reproducibilidad. En efecto, las concentraciones de los anticuerpos varían entre laboratorios y se ha mostrado que esto limita la reproducibilidad de los criterios de clasificación de la AR [183]. La concordancia de anticuerpos abre un nuevo campo para mejorar la clasificación de la AR, aumentando el número de pacientes que se clasifican correctamente con una fracción baja de falsos positivos con la ventaja añadida del aumento de la reproducibilidad entre estudios al prescindir de los títulos de los autoanticuerpos para asignar la puntuación. Así, hay más pacientes que se benefician de recibir un tratamiento en las fases tempranas de la AR mientras que el número de pacientes innecesariamente tratados representa sólo una pequeña parte y se evitan posibles efectos adversos no deseables derivados del tratamiento. Cabe destacar que desde la perspectiva de la concordancia, los anticuerpos anti-CarP sí tienen un valor añadido al de FR y ACPA en la clasificación de la AR a diferencia de lo que demostraba la evaluación de cada autoanticuerpo por separado [176]. Por el momento sólo se han analizado los anticuerpos anti-CarP en relación con la concordancia, pero es posible que otros autoanticuerpos puedan mejorar la clasificación de la AR en contexto de la EA. Un buen candidato a tener en cuenta son los AAPA. Su contribución a la clasificación de la AR parece ser insuficiente cuando se evalúan de forma individual [44] al igual que se había observado para los anticuerpos anti-CarP. Sin embargo, podrían tener un valor adicional como biomarcadores considerando su concordancia con otros autoanticuerpos, lo que nos ha llevado a evaluar las posibles mejoras en la clasificación de la AR que introduce la inclusión de los AAPA en el sistema de puntuación basado en la concordancia siguiendo la metodología empleada en un estudio anterior con los anticuerpos anti-CarP [181]. Los resultados derivados de este trabajo ya han sido publicados (Anexo 1) y se recogen en el capítulo 2.

5. BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO

La evolución de los pacientes con AR es muy variable. Algunos pueden progresar hacia una forma más grave e incapacitante de la enfermedad mientras que otros progresan hacia una forma menos grave y con menor incapacidad [1]. Determinar lo antes posible qué pacientes presentan un peor pronóstico es de vital importancia para su manejo por el reumatólogo, para lo cual es necesario identificar biomarcadores adecuados para este propósito.

La estrategia terapéutica recomendada se basa en aplicar de forma temprana un tratamiento más intenso en los pacientes en riesgo de un peor pronóstico con el objetivo de

alcanzar la remisión del paciente o al menos una baja actividad de la enfermedad [184]. Para alcanzar lo antes posible el objetivo terapéutico no sólo es importante adaptar el tratamiento en función de las necesidades del paciente, sino que además el tratamiento debe iniciarse en las fases tempranas del curso de la AR [161]. Esta importancia reside en la identificación de un periodo de tiempo denominado ventana de oportunidad en el que es imprescindible tratar al paciente para que obtenga el mayor beneficio posible [160,185,186], periodo que se corresponde con los primeros meses tras el inicio de la clínica. Con esta estrategia se obtiene un control adecuado y un mejor pronóstico de la enfermedad si se compara con el inicio del tratamiento en etapas más avanzadas de la AR [186–188]. En consecuencia, una de las recomendaciones del EULAR se centra en el inicio del tratamiento de los pacientes tan pronto como se hayan diagnosticado como AR [189]. Esta recomendación se extiende además a los pacientes con EA en los que se debe iniciar el tratamiento si presentan riesgo de una peor evolución aunque no cumplan los criterios de clasificación para ninguna enfermedad reumatológica [159].

La evolución de los pacientes con AR se monitoriza mediante el uso de índices que miden varios parámetros relacionados con la actividad de la enfermedad y con el grado de incapacidad del paciente. El índice más ampliamente empleado para medir la actividad de la AR es el índice de actividad de la enfermedad 28 (DAS 28, *Disease Activity Score*) cuyo valor se obtiene de una fórmula que incluye cuatro variables: el número de articulaciones dolorosas de un total de 28 exploradas por el reumatólogo, el número de articulaciones tumefactas de 28 exploradas, la proteína C reactiva (PCR) o la velocidad de sedimentación globular (VSG), y finalmente la escala analógica visual (VAS) que realiza el propio paciente y representa su valoración de la enfermedad [190,191]. Según el valor del DAS28 se considera que los pacientes presentan una actividad alta (DAS28 > 5.1), moderada (5.1> DAS28 > 3.2), baja (3.2 > DAS28 > 2.6) o que están en remisión (DAS28 ≤ 2.6 [191], esta definición de remisión no es suficientemente estricta según las recomendaciones actuales de la ACR y el EULAR [192]). La actividad también se puede evaluar con otros índices, como el índice simplificado de actividad de la enfermedad (SDAI, *Simplified Disease Activity Index*) y el índice clínico de actividad de la enfermedad (CDAI, *Clinical Disease Activity Index*), mientras que el grado de incapacidad funcional de los pacientes se determina habitualmente con el cuestionario de evaluación de salud (HAQ, *Health Assessment Questionnaire*) [193]. La respuesta al tratamiento se evalúa con frecuencia según el cambio de DAS28 entre antes y después del tratamiento. En función de la magnitud del cambio los pacientes se clasifican como no respondedores (cambio ≤ 0.6), respondedores moderados (cambio > 0.6 y ≤ 1.2) o buenos respondedores (cambio > 1.2) de acuerdo con los criterios de respuesta establecidos por el EULAR [194]. En caso de no obtener una buena respuesta, el tratamiento debe ajustarse hasta conseguir el objetivo terapéutico deseado [195]. Las recomendaciones actuales indican que se debe iniciar el tratamiento preferentemente con metotrexato siempre que no existan contraindicaciones, combinado o no con glucocorticoides. Si el paciente no presenta una buena respuesta se pueden combinar varios FAME sintéticos o bien incluir un FAME biológico al tratamiento [189]. El tratamiento con FAME biológicos presenta mayores efectos adversos en comparación con los FAME sintéticos [196], por lo que su administración solo es aconsejable si los pacientes presentan factores de un peor pronóstico o no han respondido al tratamiento con FAME sintéticos [189].

Los factores predictivos de un peor pronóstico aceptados en las guías del EULAR para el manejo de pacientes con AR incluyen el FR y los ACPA [195]. Su uso como biomarcadores de predicción del desarrollo de una forma de AR más grave está justificado por la asociación que

muestran con un mayor grado de actividad de la enfermedad, con una mayor incapacidad funcional y con la progresión radiológica [197–200]. Al igual que el FR y los ACPA, los anticuerpos anti-CarP también se asocian con una mayor actividad de la enfermedad, pero las discrepancias entre los estudios no permiten sacar conclusiones claras acerca de su utilidad como biomarcadores de pronóstico [142,201–203]. Tampoco se puede determinar la utilidad de los autoanticuerpos atípicos o nuevos frente a PTM como biomarcadores de este tipo debido a que los estudios transversales en los que se ha evaluado su relación con la actividad de los pacientes no permiten identificar factores pronósticos [32,33,37,38]. Aunque los AAPA se han estudiado de forma longitudinal, su relación con la actividad se evaluó en combinación con otros anticuerpos y no es posible conocer su contribución individual [130]. Por su parte, los anticuerpos anti-MAA determinados en la visita basal y a los 6 meses no se asociaron con la actividad de los pacientes medida como DAS28 [204]. La utilidad de los autoanticuerpos atípicos frente a PTM como biomarcadores de pronóstico deberá evaluarse preferentemente en cohortes de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad a través de estudios longitudinales. Sin embargo, antes de plantearse este tipo de estudios deben replicarse de forma independiente los hallazgos de los trabajos en los que se describen estos anticuerpos.

6. SISTEMAS DE AUTOANTICUERPOS EN LA AR

El FR y los ACPA son los dos sistemas de anticuerpos asociados con la AR más caracterizados y más estudiados en relación con su relevancia clínica. Ambos autoanticuerpos se detectan en pacientes con AR procedentes de diferentes colecciones a nivel mundial, mostrando valores de sensibilidad altamente reproducibles entre colecciones y un elevado grado de consistencia en las asociaciones con factores de riesgo y características clínicas de la AR. La robustez de los hallazgos relativos al FR y a los ACPA ha llevado al uso de estos anticuerpos como biomarcadores en la AR, información que se ha comentado y detallado a lo largo de esta introducción. Al igual que el FR y los ACPA, los anticuerpos anti-CarP muestran valores de sensibilidad consistentes y reproducibles entre diferentes colecciones y parecen ser relevantes en la clínica de la AR, aunque su utilidad como biomarcador es un tema que todavía se está estudiando. Por el contrario, la información disponible para los AAPA, los anticuerpos anti-MAA, los anti-MDA, los anti-Carbo, los anti-Nitra y los anti-Hci, cuyos epítopos diana se muestran en la Figura 3, es escasa y no permite sacar conclusiones acerca de su relevancia en la AR. A pesar de ello, algunos de estos anticuerpos se han incluido en el término anticuerpos anti-proteínas modificadas (AMPA) propuesto por algunos autores para referirse al conjunto de anticuerpos frente a PTM relacionados con la AR [205]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los trabajos en los que se describen los nuevos anticuerpos frente a PTM en pacientes con AR no se han replicado y que todavía no se han definido con precisión la sensibilidad ni la especificidad que muestran por la AR.

En las siguientes secciones de la introducción se describen brevemente las principales características del FR, los ACPA y los anticuerpos anti-CarP y se comentarán con más detalle los aspectos que se conocen de los anticuerpos anti-MAA, los anti-MDA, los AAPA, los anti-Carbo, los anti-Nitra y los anti-Hci relacionados con la AR. También se resaltarán las principales incógnitas en torno a cada anticuerpo que se pretenden resolver en el trabajo realizado durante esta tesis doctoral.

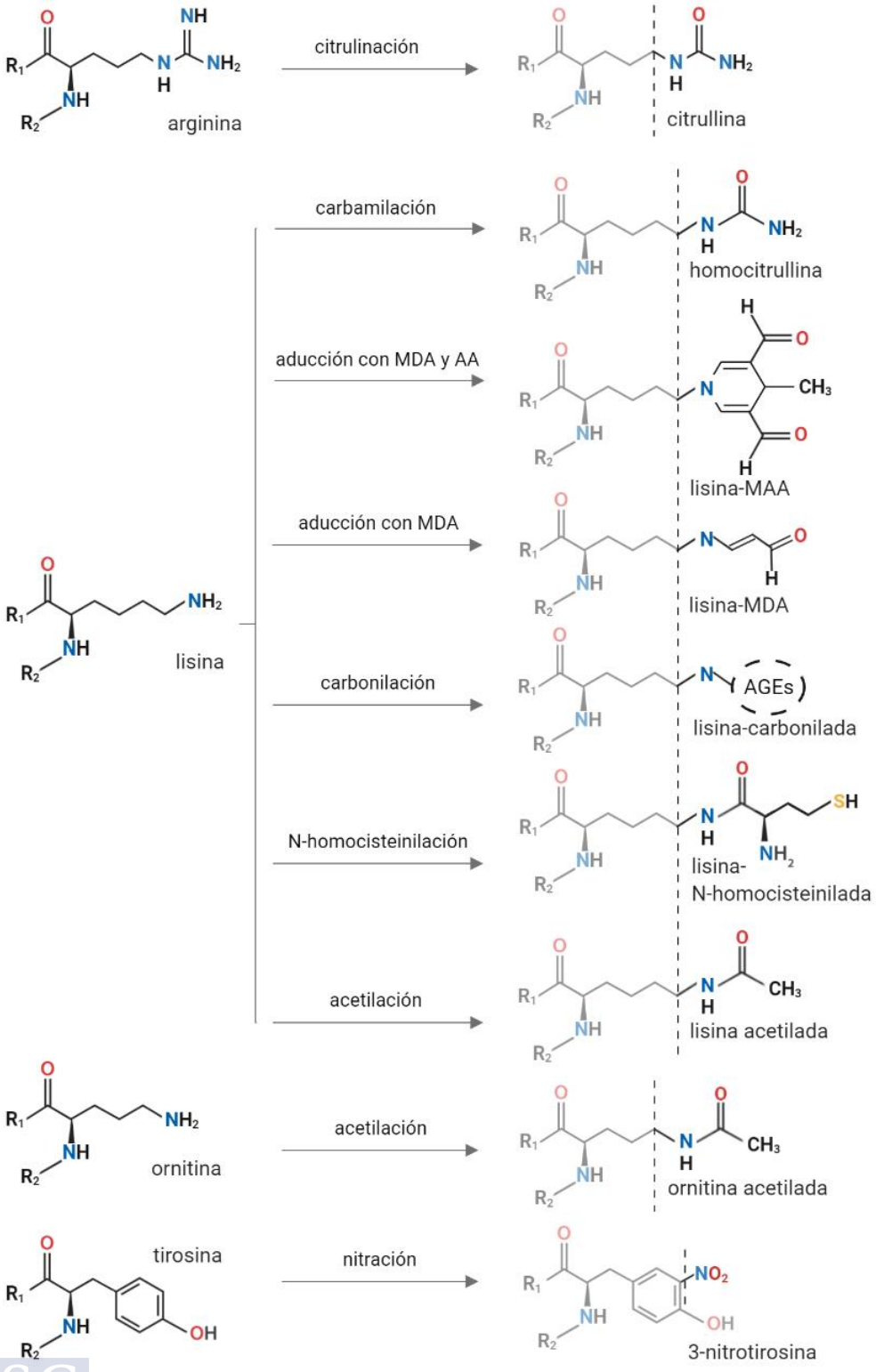


Figura 3. Estructuras de los epítopos reconocidos por los anticuerpos frente a PTM descritos en pacientes con AR. En la imagen se muestra el aminoácido que se modifica, la reacción de modificación cuyo nombre se indica sobre las flechas y el epítopo resultante de la PTM. Algunos de los epítopos presentan estructuras bien definidas mientras que otros no han sido caracterizados por completo. La ornitina no forma parte de las proteínas, por ello la reactividad frente a la ornitina acetilada se analiza empleando péptidos sintéticos. MAA: malondialdehído-acetaldehído, MDA: malondialdehído; AGEs: productos finales de glicación avanzada. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

6.1. FACTOR REUMATOIDE

El FR es un autoanticuerpo asociado con la AR que no está dirigido frente a una PTM, sino que reconoce las IgG a través de la región Fc [41]. El isotipo predominante detectado en el suero de los pacientes con AR es el IgM aunque también están presentes los isotipos IgA e IgG [206]. El FR no es un anticuerpo detectado exclusivamente en el suero de pacientes con AR, sino que se encuentra además en pacientes con otras enfermedades autoinmunes o del tejido conectivo y en sujetos sanos, aunque con una prevalencia menor que en la AR, lo que se traduce en una sensibilidad en torno al 70-90% [207] y una especificidad del 85% [207]. La elevada sensibilidad y especificidad por la AR lo convierten en un excelente biomarcador de diagnóstico mientras que su asociación con la progresión radiológica y con una peor evolución de la enfermedad ha llevado a su uso como biomarcador de pronóstico.

6.2. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CITRULINADAS

La diana de los ACPA es la citrulina [42] (Figura 3) que surge de la modificación postraduccional de la arginina en la secuencia peptídica mediante un proceso denominado citrulinación y que está catalizado por las PAD [208]. Los ACPA pueden reconocer varios epítopos citrulinados presentes en diferentes regiones de la misma proteína. Cada epítopo citrulinado se denomina especificidad fina y en conjunto, contribuyen al repertorio total de ACPA presente en los pacientes. Una fracción muy importante de ese repertorio es lo que se detecta con las pruebas comerciales anti-CCP empleadas en la práctica clínica que incluyen una veintena de péptidos gracias a que existe reactividad cruzada entre distintas especificidades finas [209–211]. Se desconoce el conjunto total de proteínas citrulinadas frente a las que los pacientes con AR desarrollan ACPA, aunque el fibrinógeno [212], la vimentina [213] y la enolasa α [214] destacan entre las proteínas citrulinadas identificadas como potenciales autoantígenos. El patrón de especificidades finas que reconocen los ACPA es altamente heterogéneo [91,145,209] y su reactividad se encuentra mayoritariamente en los pacientes ACPA positivos [209]. Sin embargo, existen pacientes que se detectan como ACPA positivos mediante el test anti-CCP pero dan resultados negativos cuando se emplean como antígenos proteínas/péptidos citrulinados concretos, lo que sugiere la existencia de más autoantígenos citrulinados [209].

Las histonas han surgido como nuevos autoantígenos en la AR. Estas proteínas en su versión citrulinada se detectan en el tejido sinovial y en el líquido sinovial de pacientes con AR [215–218]. En este punto cabe destacar el trabajo de Meng X *y col.* en el que las histonas citrulinadas fueron las proteínas más frecuentemente aisladas de los IC formados por ACPA provenientes del líquido sinovial de pacientes con AR, especialmente la histona H4 (89%) [217]. La importancia de este hallazgo reside en que de todos los autoantígenos propuestos en la AR hasta el momento, sólo la vimentina se aisló de los IC obtenidos de los líquidos sinoviales en este trabajo, aunque con una frecuencia considerablemente menor (5%) que la de las histonas. Además, las histonas han sido identificadas como la diana principal de ACPA monoclonales aislados de células B provenientes de la sinovia de pacientes con AR [219]. También se han detectado ACPA dirigidos frente a histonas citrulinadas en el suero de pacientes con AR, tanto en la fase preclínica [91,220] como en la fase clínica de la enfermedad [217,221–223] al igual que se ha observado para los ACPA que reconocen otras proteínas citrulinadas. Uno de los resultados más llamativos sobre la relevancia de las histonas como autoantígenos es la

marcada inmunodominancia de los anticuerpos que reconocen un péptido citrulinado derivado de la histona H4 (cH4/39-40) cuya prevalencia fue del 92 – 95% en los pacientes con AR ACPA positivos de dos colecciones diferentes [217], muy superior a la descrita para otros autoantígenos citrulinados [209,224,225]. Sin embargo, esta frecuencia tan llamativa no ha sido confirmada de forma independiente. Tampoco se ha explorado la posible asociación de los anticuerpos anti-cH4/39-40 con las características clínicas de la AR ni su relación con los anticuerpos anti-CCP ni con los anticuerpos que reconocen otras especificidades finas citrulinadas a pesar de identificarse como un anticuerpo predominante. Todas estas cuestiones se abordarán en este proyecto de tesis.

6.3. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS

Los anticuerpos anti-CarP se detectan con una sensibilidad reproducible en cohortes de pacientes con AR de diferente origen, cuantificada en torno al 30 – 40% [47,70,71,226,227] y presentan una elevada especificidad [228] . Sin embargo, la utilidad de los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores en la AR no está tan clara ya que se cuestiona si añaden información útil a la proporcionada por el FR y los ACPA.

La diana de los anticuerpos anti-CarP es la homocitrulina (Figura 3), un aminoácido que surge de la carbamilación de proteínas [43], una reacción no enzimática en la que el cianato (OCN^-) interacciona preferentemente con los grupos amino de las lisinas de las proteínas para formar homocitrulina [229] Otros aminoácidos y grupos funcionales son susceptibles de reaccionar con el cianato aunque en menor medida que la lisina [230,231]. Las fuentes fisiológicas de cianato son la urea y el tiocianato (SCN^-). El cianato y la urea se encuentran en equilibrio químico, por lo que un aumento de la concentración de urea como el que se produce en los pacientes urémicos con síndrome renal crónico [232] provoca un aumento en la concentración de cianato. El tiocianato también puede verse aumentado por la dieta y el tabaco [229], lo que favorece su conversión a cianato a través de la acción enzimática de la MPO [84] .

La homocitrulina reconocida por los anticuerpos anti-CarP presenta una elevada similitud estructural con la citrulina (Figura 3). En vista de la homología entre homocitrulina y citrulina, no sorprende que los anticuerpos anti-CarP y los ACPA muestren un cierto nivel de reactividad cruzada [44,233,234]. A pesar de ello, los anticuerpos anti-CarP conforman un sistema de autoanticuerpos independiente de los ACPA como evidencian varios trabajos que muestran que los factores de riesgo genéticos y ambientales asociados con la AR anti-CarP positiva difieren de los asociados con la AR ACPA positiva [56,70,71]. Además, aunque los anticuerpos anti-CarP se encuentran preferentemente en pacientes ACPA positivos, su presencia en aproximadamente el 20% de los pacientes ACPA negativos [43,70,137] refuerza la independencia de los ACPA y los anticuerpos anti-CarP.

6.4. ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS ACETILADOS

Los AAPA reconocen péptidos acetilados en diferentes aminoácidos, en concreto la lisina y la ornitina [44,235]. La acetilación es una reacción enzimática reversible que introduce un grupo acetilo en los aminoácidos, preferentemente en las lisinas, aunque otros residuos que contienen aminas también son susceptibles de modificarse. A nivel fisiológico la acetilación está catalizada por las acetiltranferasas mientras que las deacetilasas catalizan la reacción

inversa [236]. También puede producirse la acetilación no enzimática de proteínas en presencia de altas concentraciones de acetil coenzima A y a pH básico [237].

La determinación de los AAPA se ha evaluado con un ELISA que emplea como antígeno un péptido derivado de la secuencia de la vimentina mutada empleada en el kit MCV (Figura 4) en el que la citrulina en posición 7 se ha sustituido por una lisina acetilada (anti-AcLys) o una ornitina acetilada (anti-AcOrn) [44,235]. Se han diseñado otros péptidos adicionales que incluyen esas mismas PTM en la posición 2 del péptido MCV, pero la acetilación en posición 7 es la que captura más reactividad [130,235]. Los anticuerpos anti-AcLys presentan niveles bajos de reactividad cruzada con los ACPA y con los anticuerpos anti-CarP [44] a pesar de la alta analogía estructural existente entre la lisina acetilada, la citrulina y la homocitrulina (Figura 3), lo que indica que conforman un sistema de autoanticuerpos independiente. Otra evidencia a favor de la independencia de los AAPA es su presencia en torno al 13 – 55% de pacientes seronegativos [44,178,179,235].

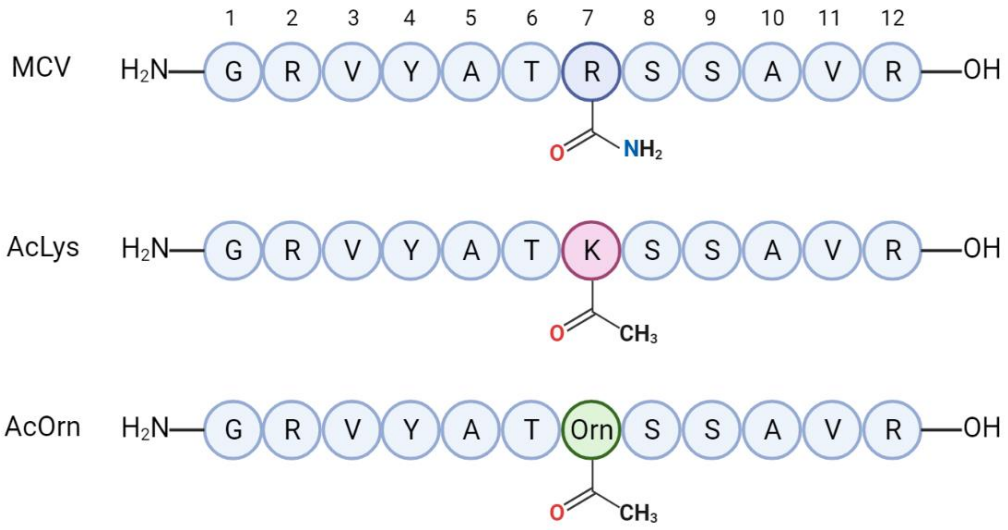


Figura 4. Péptidos acetilados empleados como antígenos para la determinación de AAPA. La citrulina en posición 7 del péptido MCV se ha sustituido por una lisina acetilada o por una ornitina acetilada mientras que el resto de la secuencia es idéntica. En el péptido MCV se muestra la estructura del grupo amida presente en la citrulina mientras que en los péptidos AcLys y AcOrn se muestra la estructura del grupo acetilo. Los aminoácidos se representan con el código de una letra excepto para la ornitina designada como Orn [235] desde el extremo amino terminal hasta el C terminal. Los números indican la posición de cada aminoácido en la secuencia del péptido. MCV = péptido de vimentina mutada citrulinada, AcLys = péptido con lisina acetilada, AcOrn = péptido con ornitina acetilada, H_2N– = extremo amino terminal, –OH = extremo carboxilo terminal. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Aunque los AAPA parecen ser un nuevo sistema de anticuerpos presentes en la AR todavía se desconocen muchas de sus características, como las proteínas endógenas acetiladas que reconocen, su relación con los factores genéticos de riesgo, su posible implicación en la patogénesis de la enfermedad, su relevancia para el manejo de los pacientes o su utilidad para la clasificación de la AR. Esclarecer esta última incógnita es uno de los objetivos principales de este proyecto de tesis.

6.5. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO-ACETALDEHÍDO

Los anticuerpos anti-MAA reconocen aductos de MAA generados por la oxidación no enzimática de proteínas con malondialdehído y acetaldehído. Esta modificación ocurre principalmente en el grupo amina en posición ε de la lisina [238] y difieren de los aductos que se forman en la reacción de cada aldehído por separado [239]. El análisis estructural y la caracterización química de los aductos de MAA muestran que tras la reacción *in vitro* se generan dos estructuras predominantes (Figura 5). Una de ellas es el compuesto 4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldehído también denominado aducto MDHDC que resulta de la reacción de dos moléculas de malondialdehído con una de acetaldehído y una lisina [240,241]. El anillo de piridina le confiere propiedades fluorescentes y su estructura cíclica le proporciona una alta estabilidad. La otra estructura mayoritaria es el compuesto 2-formil-3-(alquilamino)butanal o aducto FAAB formado a partir de la reacción equimolecular de malondialdehído con acetaldehído y una lisina (Figura 5). Este aducto carece de propiedades fluorescentes y es más lábil en comparación con el aducto MDHDC [241]. La fuente fisiológica de malondialdehído y de acetaldehído es la LPO de ácidos grasos [242] ya que el malondialdehído puede descomponerse de forma espontánea para generar acetaldehído [243]. El tabaco también contribuye al aumento de los niveles de aldehídos reactivos lo que aumenta la disponibilidad tanto de malondialdehído como de acetaldehído. No se ha detectado reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-MAA y los ACPA, probablemente porque los epítopos que reconoce cada autoanticuerpo no están relacionados estructuralmente (Figura 3) y se consideran anticuerpos independientes.

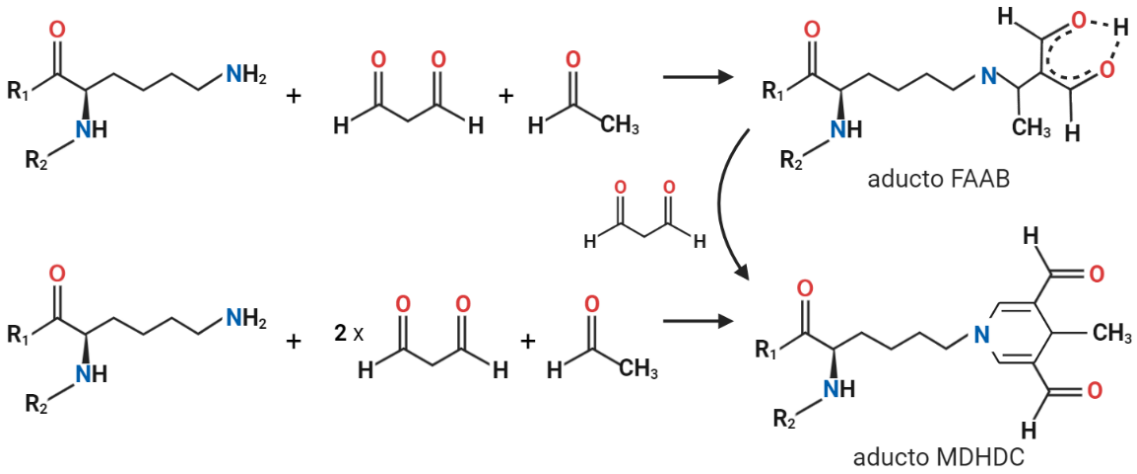


Figura 5. Formación de los dos aductos mayoritarios de MAA en las proteínas. Se muestra una representación simplificada de las reacciones propuestas para la formación de los dos aductos de MAA mayoritarios, el aducto FAAB y el aducto MDHDC. La generación del aducto FAAB se produce por la reacción de la lisina de las proteínas con una molécula de malondialdehído y una de acetaldehído, mientras que la formación del aducto MDHDC se produce por la reacción de dos moléculas de malondialdehído con una de acetaldehído. Una vez formado, el aducto FAAB menos estable puede reaccionar con otra molécula de malondialdehído para formar el aducto MDHDC más estable. R_1 y R_2 = cadena de aminoácidos de la proteína. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

La presencia de anticuerpos anti-MAA en relación con la AR se ha descrito por primera vez en pacientes con una enfermedad establecida procedentes del registro *Veterans Affairs Rheumatoid Arthritis* (VARA) que recopila información de veteranos de guerra de varios centros médicos de Estados Unidos [32]. En estos pacientes, Thiele *y col.* detectaron los isotipos IgG, IgM e IgA de los anticuerpos anti-MAA con una sensibilidad sorprendentemente superior a la de los anticuerpos descritos hasta el momento en la AR, incluidos los ACPA [32]. Más del 90% de los pacientes presentaron anticuerpos del isotipo IgG, mientras que la presencia de los isotipos IgA e IgM fue menor, del 73% y 38% respectivamente. Un hallazgo de gran relevancia potencial fue la notable presencia de los anticuerpos anti-MAA en los pacientes ACPA negativos: 88% para el isotipo IgG, 63% para el isotipo IgA y 29% para el isotipo IgM, de nuevo muy superior a la descrita para otros anticuerpos. Los mismos autores de este trabajo ampliaron el estudio de los anticuerpos anti-MAA en pacientes con varias enfermedades reumáticas incluyendo pacientes con AR reclutados de cuatro centros médicos de veteranos estadounidenses (VAMC, *Veterans Affairs Medical Centers*) [39]. En estos pacientes volvieron a observar una elevada sensibilidad de los anticuerpos anti-MAA. especialmente de los isotipos IgG e IgA [39]. Sin embargo, no se replicó la asociación con el tabaquismo descrita con el isotipo IgM en el estudio de Thiele *y col.* [32], siendo el isotipo IgA el asociado con el tabaco en el estudio de Mikuls *y col.* [39]. Los anticuerpos anti-MAA de isotipo IgG también se han evaluado en pacientes con AR de la cohorte *Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis* (EIRA) procedentes de la población de Suecia [204,244]. Empleando un enfoque algo distinto para definir la positividad, los autores de este trabajo han descrito una sensibilidad para los anticuerpos IgG anti-MAA del 44% en el conjunto de pacientes con AR y del 33% en el subgrupo anti-CCP negativo, valores notablemente inferiores a los descritos para el isotipo IgG en los dos trabajos previos.

La sorprendente sensibilidad descrita en los pacientes seronegativos no sólo cambia la perspectiva acerca de la existencia de la AR sin autoanticuerpos sino que abre la posibilidad de utilizar a los anticuerpos anti-MAA como biomarcadores en ese subgrupo de pacientes. Sin embargo, los anticuerpos anti-MAA no son específicos de la AR detectándose además en pacientes con otras enfermedades reumáticas [39], enfermedades cardiovasculares [245–248], daño hepático [249,250], daño pulmonar [251–253] o diabetes [254], lo que pone en duda su utilidad como biomarcador. La falta de replicación y de validación independiente de los hallazgos en relación con la sensibilidad unida a la falta de especificidad de los anticuerpos anti-MAA impide sacar conclusiones claras acerca del papel de estos anticuerpos en la AR. Por ello, otro de los objetivos enmarcados en este proyecto de tesis es el estudio de los anticuerpos anti-MAA en una colección independiente de pacientes con AR con el fin de establecer la sensibilidad de estos anticuerpos, identificar asociaciones relevantes con las características clínicas de los pacientes y determinar su posible utilidad como biomarcadores, en especial en los pacientes seronegativos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.6. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO

Los anticuerpos anti-MDA reconocen aductos de MDA generados en las proteínas a través de la reacción de oxidación no enzimática con malondialdehído. La estructura mayoritaria de estos aductos es la 2-(propenal)lisina (Figura 3) formada tras modificación de la lisina [255], aunque otros aminoácidos también son susceptibles de modificarse [26,256]. Los anticuerpos anti-MDA no reconocen antígenos citrulinados mientras que su interacción con proteínas carbamiladas es mínima [33], por lo que los anticuerpos anti-MDA se consideran independientes de los ACPA y de los anticuerpos anti-CarP. Los anticuerpos anti-MDA y los anti-MAA reconocen epítopos formados a partir de un precursor común, el malondialdehído, pero están dirigidos frente a epítopos poco relacionados estructuralmente (Figura 3) [239] por lo que no se espera que exista reactividad cruzada. Efectivamente, existe poca interferencia entre los anticuerpos anti-MDA y los anti-MAA cuando se evalúa mediante ensayos de competición [257]. Además, también se ha observado que los anticuerpos anti-MDA presentes en el suero de pacientes con enfermedad hepática inducida por alcohol reconocen mayoritariamente los aductos de MDA mostrando un reconocimiento mínimo de la estructura MAA [250]. Sin embargo, hasta ahora ningún trabajo ha evaluado estos anticuerpos en la misma colección de pacientes con AR y se desconoce con seguridad si son anticuerpos independientes o no. Esta incógnita pretende resolverse como parte de los objetivos de este trabajo. También se pretende validar la prevalencia descrita para los anticuerpos anti-MDA en pacientes con AR, que es del 28% para el isotipo IgG y algo inferior para el isotipo IgM [33], así como identificar posibles asociaciones con factores de riesgo de la enfermedad y características clínicas de los pacientes. Otro de nuestros objetivos es determinar si estos anticuerpos podrían ser de utilidad como biomarcadores en la AR, aunque su detección en otras enfermedades reumáticas [258–261] y en enfermedades pulmonares [262] indica que no son específicos.

6.7. ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CARBONILADAS

La carbonilación de proteínas se produce a través de reacciones no enzimáticas en las que intervienen diferentes agentes carbonilantes y como consecuencia aumenta el número de grupos carbonilos (C=O) presentes en las proteínas. Así, dos tipos de reacciones de carbonilación de proteínas son las reacciones de oxidación con algunas ROS y las reacciones de glicación con carbohidratos reductores como la ribosa [263]. La carbonilación de proteínas da lugar a la formación de un grupo heterogéneo de compuestos y entrecruzamientos denominados en su conjunto productos finales de glicación avanzada (AGEs, *advanced glication end products*) [8,264]. La formación de AGEs se produce principalmente sobre la lisina, aunque otros aminoácidos también son susceptibles de modificarse dependiendo de las condiciones de reacción y del tipo de proteína [265]. Algunos AGEs han sido ampliamente caracterizados como es el caso de la pentosidina, un entrecruzamiento entre lisina y arginina cuya estructura está bien definida (Figura 6). La pentosidina, así como otros compuestos estructuralmente relacionados, presentan propiedades fluorescentes idénticas, lo que ha llevado a nombrarlos en conjunto como productos de tipo pentosidina (PTP) [266]. Bajo condiciones de reacción agresivas como una concentración elevada de agentes carbonilantes o una exposición prolongada, los enlaces peptídicos de las proteínas también pueden llegar a romperse lo que resulta en la fragmentación de la proteína [267].

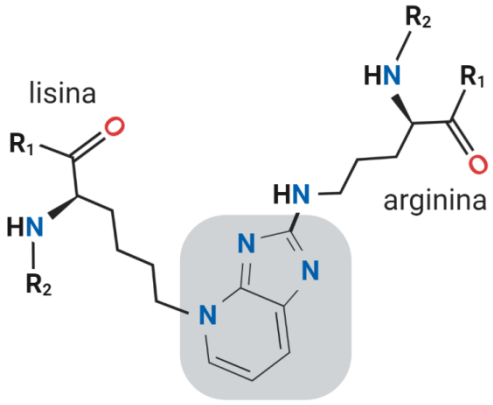


Figura 6. Estructura de la pentosidina. La pentosidina es un entrecruzamiento entre lisina y arginina que puede formarse tras la carbonilación de proteínas. Su estructura (sombreada en gris) es la que le confiere propiedades fluorescentes características. R_1 y R_2 = cadena de aminoácidos de la proteína. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Algunos estudios han mostrado que los pacientes con AR presentan en el suero anticuerpos anti-Carbo frente a diversas proteínas carboniladas entre las que se encuentran la albúmina sérica humana (HSA) [268], la IgG [269–272] y el CII [30,37]. Los estudios que emplean CII como antígeno carbonilado han proporcionado resultados especialmente llamativos. Destaca especialmente el trabajo realizado por Strollo *y col.* [37]. Estos autores estudiaron pacientes con AR temprana en los que detectaron la presencia de anticuerpos que reconocen el CII carbonilado con HOCl (anti-HOCl) con una sensibilidad del 92.9% en el total de los pacientes y del 91.6% en los pacientes ACPA negativos. Este resultado supone la desaparición del concepto de seronegatividad en la AR y presenta a los anticuerpos anti-HOCl-CII como potenciales biomarcadores, especialmente en los pacientes con AR que carecen de otros autoanticuerpos. Los autores de este trabajo también detectaron la presencia de anticuerpos que reconocen el CII modificado con ribosa (anti-GLI-CII) aunque con una sensibilidad inferior: 64.7% en los pacientes con AR temprana y 55.5% en los pacientes ACPA negativos [37]. Además, los anticuerpos anti-HOCl-CII y anti-GLI-CII no sólo presentan una elevada sensibilidad sino que muestran especificidad por la AR [30,37]. Estos resultados, aunque prometedores, necesitan ser confirmados y validados de forma independiente, por lo que uno de los objetivos de este trabajo es evaluar la presencia de anticuerpos anti-Carbo, concretamente los anti-HOCl-CII y los anti-GLI-CII.

6.8. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS NITRADAS

Los anticuerpos anti-Nitra reconocen la 3-nitrotirosina (3-NT) generada a partir de la nitración de la tirosina con el ONO_2^- (Figura 3), aunque otros aminoácidos como el triptófano, la fenilalanina y la cisteína también son susceptibles de nitrarse [273,274]. Al igual que se ha comentado para las reacciones de carbonilación con HOCl, unas condiciones agresivas de nitración pueden producir la fragmentación de las proteínas [274].

La presencia de anticuerpos anti-Nitra en relación con la AR se ha descrito en dos trabajos diferentes en colecciones de pacientes que proceden de la India utilizando un

polipéptido de tirosina en un caso y la histona H2A en el otro. En ambos estudios, la reactividad frente a la 3-NT fue muy superior en los pacientes con AR, pero no se llegó a especificar su sensibilidad [35,275]. Aunque estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-Nitra podrían constituir un nuevo sistema de anticuerpos en la AR, necesitan ser validados en otras colecciones de pacientes. Por otra parte, se han descrito anticuerpos anti-Nitra en pacientes con otras enfermedades reumáticas como el LES y la artrosis a un nivel comparable al detectado en pacientes con AR [35,276,277], además de detectarse en pacientes con enfermedad coronaria [278] y con daño pulmonar [279]. Esta baja especificidad de los anticuerpos anti-Nitra por la AR cuestiona su utilidad como biomarcador en la enfermedad. En consecuencia, uno de los objetivos de este proyecto de tesis consiste en analizar las características de los anticuerpos anti-Nitra en una colección independiente de pacientes con AR establecida.

6.9. ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS

La homocisteinilación es una reacción no enzimática en la que la homocisteína libre o su tioéster cíclico homocisteína tiolactona se unen de forma covalente a las proteínas [280]. La homocisteína tiolactona favorece la reacción de N-homocisteinilación sobre las lisinas, mientras que la homocisteína libre favorece la reacción de S-homocisteinilación sobre las cisteínas, lo que da lugar a la formación de dos estructuras diferentes, lisina homocisteinilada y cisteína homocisteinilada, respectivamente [280] (Figura 7).

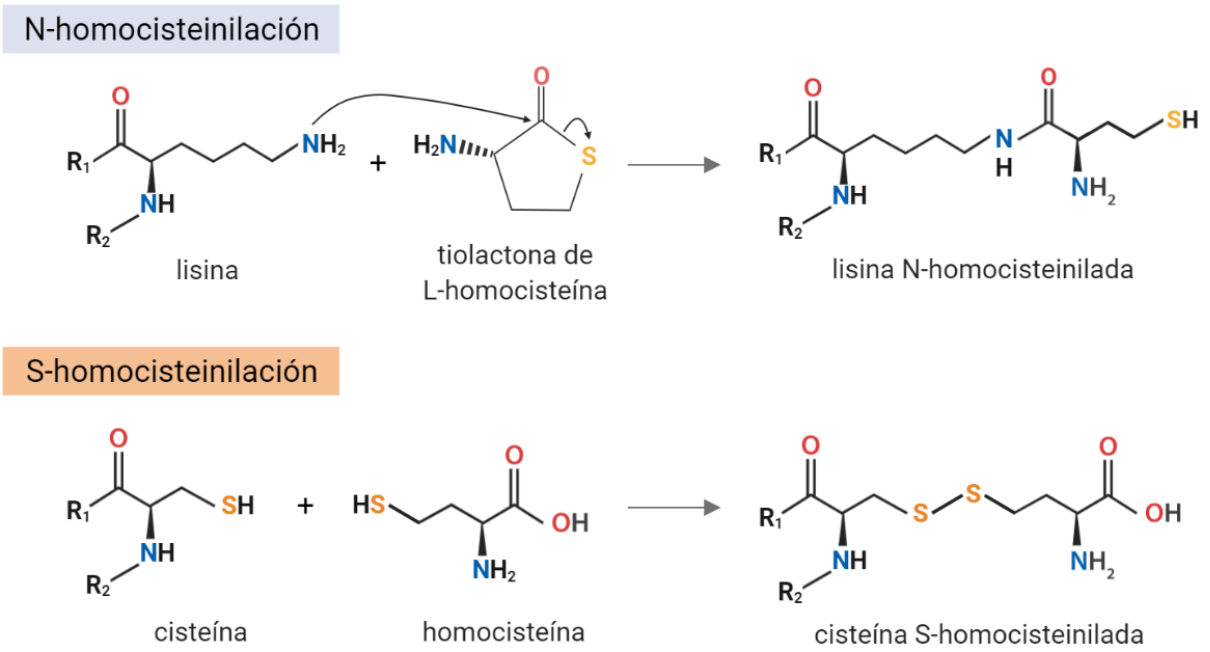


Figura 7. Homocisteinilación de proteínas. Esquema simplificado de la reacción de N-homocisteinilación sobre la lisina y de S-homocisteinilación sobre la cisteína. La tiolactona de L-homocisteína da lugar a la reacción de N-homocisteinilación mientras que la homocisteína da lugar a la S-homocisteinilación. R_1 y R_2 = cadena de aminoácidos de la proteína. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

La homocisteína es un aminoácido que participa en el metabolismo de la metionina y a diferencia de éste, no forma parte de la estructura de las proteínas. Su conversión a homocisteína tiolactona evita la incorporación de la homocisteína a la secuencia de las proteínas que puede tener lugar debido a su semejanza estructural con la metionina [281]. Algunos factores que contribuyen al aumento de la concentración fisiológica de homocisteína son la alteración de las rutas metabólicas en las que participa, defectos en su eliminación, la dieta y el consumo de tabaco [282,283].

La presencia de anticuerpos anti-Hci se ha detectado en un trabajo estudiando pacientes con AR que mostraron un aumento de los niveles del 21 – 22% respecto de los niveles detectados en los controles sanos, aunque no se ha determinado el porcentaje de positivos [38]. La estratificación de los pacientes según su seropositividad para el FR o los anticuerpos anti-CCP no mostró diferencias en los niveles de los anticuerpos anti-Hci. Aunque estos resultados relacionan a los anticuerpos anti-Hci con la AR, provienen de un único estudio y necesitan ser validados. Además, existen evidencias que indican que los anticuerpos anti-Hci no son específicos de la AR, detectándose también en pacientes con LES [284], enfermedades renales [285,286], enfermedades cardiovasculares [287] y enfermedades cerebrovasculares [288]. Por ello, otro de los objetivos enmarcados en este trabajo es confirmar de forma independiente la presencia de anticuerpos anti-Hci en pacientes con AR y obtener información adicional que contribuya a definir la importancia de estos anticuerpos en la enfermedad.

Aunque el FR y los ACPA han mostrado ser de gran utilidad clínica, todavía existe una fracción importante de pacientes con AR seronegativos que requieren de biomarcadores adicionales. La identificación de nuevos anticuerpos frente a PTM puede contribuir a resolver la necesidad de biomarcadores de diagnóstico, de pronóstico y de respuesta al tratamiento en la AR. En este sentido, los anticuerpos anti-MAA y los anti-Carbo son altamente prometedores dada la elevada prevalencia descrita en los pacientes seronegativos. Otros anticuerpos como los anti-MDA, los anti-Hci y los anti-Nitra también podrían mostrar utilidad clínica. Sin embargo, todavía es indispensable resolver las incógnitas acerca de la prevalencia de estos anticuerpos en la AR. Por el momento, se desconoce si los anticuerpos atípicos o nuevos frente a PTM se detectan en otras colecciones de pacientes con AR con la elevada sensibilidad descrita, ni tampoco se ha evaluado su asociación con los factores de riesgo o las características clínicas de la AR. La única excepción se aplica a los AAPA, cuya presencia se ha confirmado en varias colecciones. Sin embargo, una cuestión importante aún sin respuesta de los AAPA es si tienen valor para mejorar la clasificación de los pacientes con EA. El único estudio que ha abordado esta cuestión indica que carecen de potencial para mejorar la clasificación, aunque algunas evidencias de otros trabajos apuntan hacia una posible mejoría de la clasificación de los pacientes seronegativos. En relación con los anticuerpos anti-cH4-39/40 son varias las cuestiones todavía por aclarar, como su extraordinaria inmunodominancia, con gran solapamiento con los anti-CCP, su relación con otros anticuerpos frente a proteínas citrulinadas y su posible asociación con factores de riesgo de la AR. Todas estas incógnitas se abordarán en el presente proyecto.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Comprobar si los anticuerpos frente al péptido de la histona H4 citrulinado cH4/39-40 son inmunodominantes entre los anticuerpos detectados con el ensayo anti-CCP, y analizar su relación con los anticuerpos frente a otras especificidades finas citrulinadas, así como con los factores de riesgo de la AR y sus características clínicas.

2. Evaluar el potencial de los anticuerpos anti-péptidos acetilados para clasificar a los pacientes con artritis de reciente comienzo como AR, de forma individual o en combinación con el FR y los anti-CCP.

3. Determinar la prevalencia, valor diagnóstico y asociaciones clínicas de los anticuerpos anti-malondialdehído-acetaldehído y anti-malondialdehído, así como la relación entre estos dos tipos de anticuerpos en el suero de los pacientes con AR.

4. Estudiar tres tipos de anticuerpos atípicos frente a modificaciones postraduccionales de proteínas: los anticuerpos anti-proteínas carboniladas, anti-proteínas nitradas y anti-proteínas homocisteiniladas, para determinar su relevancia en la AR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES

Se han incluido muestras de suero de pacientes procedentes de dos hospitales de Madrid, pacientes de la cohorte de EA del Hospital Universitario La Paz [122] y pacientes del registro longitudinal de artritis reciente del Hospital Universitario La Princesa [123]. También se han incluido sueros de pacientes con AR temprana y AR establecida del Hospital Clínico Universitario de Santiago que fueron estudiados de forma transversal [70]. Los sujetos sanos considerados como controles procedieron del Hospital Clínico Universitario de Santiago. En el apartado de resultados se detallarán las características de los pacientes.

1.1. PACIENTES CON ARTRITIS DE RECIENTE COMIENZO

Los pacientes con EA empleados en el proyecto provienen de dos centros diferentes, el Hospital Universitario La Paz y el Hospital Universitario La Princesa, ambos situados en Madrid. Los pacientes se han reclutado de manera prospectiva desde julio del 2001 hasta diciembre del 2014 en el estudio PEARL (*Princesa Early Arthritis Register Longitudinal study*, por sus siglas en inglés) [123] en el Hospital Universitario La Princesa y desde enero del 1993 hasta diciembre del 2013 en el Hospital Universitario La Paz [122]. Estos pacientes presentaron dos o más articulaciones inflamadas durante un periodo inferior a un año y no recibieron tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) en el momento de la primera visita. En las dos cohortes se ha realizado un seguimiento protocolizado de los pacientes de al menos dos años, con visitas programadas cada 6 meses.

Para el estudio del papel de los anticuerpos anti-péptidos acetilados en el diagnóstico de la AR se utilizaron 525 muestras de la cohorte de La Paz y 537 de la cohorte PEARL. Estos pacientes se seleccionaron por haber completado dos años de seguimiento y por disponer de muestra de suero de la visita basal. Al final del seguimiento, se clasificaron los pacientes de acuerdo con los criterios ACR de 1987 para la clasificación de la AR [162].

1.2. PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA ESTUDIADOS TRANSVERSALMENTE

Estos pacientes provienen del Hospital Clínico Universitario de Santiago y fueron examinados por un reumatólogo experimentado que los clasificó de acuerdo a los criterios ACR de 1987 para la clasificación de la AR [162]. Un total de 182 pacientes reclutados antes de que hubiesen pasado dos años desde el inicio de los síntomas fueron utilizados para el estudio de los anticuerpos anti-colágeno II. Los pacientes seleccionados presentaron una edad de inicio de los síntomas de 58 años y el 61.5% eran mujeres.

1.3. PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE ESTABLECIDA

La colección de pacientes con AR establecida del Hospital Clínico Universitario de Santiago se obtuvo de forma transversal e incluye pacientes con AR clasificados de acuerdo con los criterios ACR de 1987 [162]. Esta colección está formada por 520 pacientes que al diagnóstico tenían 48.6 años, el 76.7% son mujeres y al ser reclutados llevaban 12.1 años de evolución. Estos pacientes se incluyeron en los análisis para evaluar la presencia de anticuerpos frente a

varias modificaciones postraduccionales de las proteínas: los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA dirigidos frente a aductos de malondialdehído-acetaldehído y de malondialdehído respectivamente; los anticuerpos anti-cH4/39-40 frente a un péptido citrulinado de la histona H4; y los anticuerpos anti-Hci y anti-Nitra frente a proteínas sinoviales homocisteiniladas y nitradas y contra péptidos nitrados.

1.4. CONTROLES

Los controles se reclutaron en el Hospital Clínico Universitario de Santiago. Se emplearon un total de 272 sujetos sin enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Estos sujetos presentaron una edad de reclutamiento de 69.8 años, siendo el 48.2% mujeres. Los sueros se emplearon para establecer el punto de corte para definir la positividad para los diferentes anticuerpos estudiados en este proyecto.

2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y al informe Belmont, y de acuerdo a ley biomédica española (Ley Española de Investigación Biomédica nº 14/2007). En consecuencia, 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 (código de registro nº 2014/387 y nº 2017/514; Anexos 2 y 3).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS MODIFICADOS POSTRADUCCIONALMENTE

Para la realización de este trabajo se han empleado una gran variedad de proteínas y péptidos así como de agentes modificantes. Estos agentes se han utilizado para generar las distintas modificaciones postraduccionales mediante reacciones químicas *in vitro* en el caso de las proteínas. Los péptidos se han obtenido ya modificados bajo demanda. Estos antígenos se emplearon en su forma modificada y en su forma nativa sin modificar en ensayos ELISA con el objetivo de evaluar si las modificaciones postraduccionales son reconocidas de forma específica por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con AR. En esta sección se describen con detalle los protocolos empleados para la obtención de cada una de las modificaciones postraduccionales, información que se encuentra resumida en la Tabla 3.

Tabla 3. Modificaciones postraduccionales estudiadas. Se muestra la modificación, el reactivo utilizado, la proteína diana modificada, la abreviatura empleada para referirse a cada uno de los antígenos (proteínas/péptidos) modificados y la referencia de la que se ha obtenido la metodología para generar las modificaciones postraduccionales. Los péptidos se obtuvieron modificados de forma comercial. c(péptido): péptido citrulinado, Ac(aminoácido): aminoácido acetilado en la posición 7 de la secuencia del péptido MCV, MAA-HSA: aductos de malondialdehído-acetaldehído de albúmina humana, MDA-BSA: aductos de malondialdehído de albúmina bovina, HOCl-CII: colágeno tipo II bovino carbonilado con HOCl, GLI-CII: colágeno tipo II bovino glicado, 3-NT-PS: proteínas sinoviales nitradas, 3-NT-(péptido): péptido nitrado, Hci-PS: proteínas sinoviales homocisteiniladas. MCV = vimentina mutada citrulinada. Los péptidos citrulinados utilizados se encuentran en la Tabla 4 y los péptidos nitrados en la Tabla 5.

Modificación	Agente modificante	Proteína / péptido	Abreviatura
Citrulinación [144,217,289,290]	-	Péptidos seleccionados	c(péptido)
Acetilación [44,235]	-	Péptidos de MCV	Ac(aminoácido)
Aducción oxidativa [32]	Malondialdehído y acetaldehído	Albúmina humana (HSA)	MAA-HSA
	Malondialdehído	Albúmina bovina (BSA)	MDA-BSA
Carbonilación [30]	Ácido hipocloroso (HOCl)	Colágeno tipo II bovino (CII)	HOCl-CII
	Ribosa	Colágeno tipo II bovino (CII)	GLI-CII
Nitración [35]	Peroxinitrito de sodio ($NaONO_2$)	Proteínas sinoviales	3-NT-PS
	-	Péptidos seleccionados	3-NT-(péptido)
Homocisteinilación [38]	L-homocisteína tiolactona (L-Hci-tiolactona)	Proteínas sinoviales	Hci-PS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

3.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CITRULINADOS Y NATIVOS

La presencia de anticuerpos frente a la histona H4 citrulinada se evaluó empleando un péptido sintético citrulinado y el correspondiente péptido con arginina a modo de control. Los resultados se compararon con los anticuerpos frente a otros péptidos citrulinados reconocidos como autoantígenos en la AR: la enolasa, el fibrinógeno y la vimentina. Estos anticuerpos han sido determinados previamente en nuestro grupo [291], pero algunos resultados no han sido publicados (A. Montes, no publicado). Las características de los péptidos empleados se recogen en la Tabla 4. Todos los péptidos se sintetizaron biotinilados en el extremo carboxilo terminal por Schafer-N (Copenhagen, Denmark) con una pureza superior al 90%, a excepción del péptido cíclico citrulinado de la enolasa (CEP-1) que se obtuvo de Abcam (Cambridge, UK) sin biotinilar y con una pureza superior al 95%.

Tabla 4. Características de los péptidos citrulinados empleados. Los péptidos citrulinados contienen citrulina (cit) en vez de las argininas (R) presentes en los péptidos nativos.

Péptido	Proteína	Estructura	Secuencia de aminoácidos
cH4/39-40 [217]	Histona H4	Lineal	AIRRLA(cit)(cit)GGVKRIS
H4/39-40 [217]	Histona H4	Lineal	AIRRLARRGGVKRIS
CEP-1 [289]	α-enolasa	Cíclico	CKIHA(cit)EIFDS(cit)GNPTVECK
cVim60-75 [290]	Vimentina	Lineal	VYAT(cit)SSAV(cit)L (cit)SSVP
cVim2-17 [144]	Vimentina	Lineal	ST(cit)SVSSSSY(cit) (cit)MFGG
cFibβ36-52 [290]	Fibrinógeno, cadena β	Lineal	NEEGFFSA(cit)GHRPLDKK
cFibα27-43 [144]	Fibrinógeno, cadena α	Lineal	FLAEGGGV(cit)GPRVVERH

3.2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ACETILADOS

Los anticuerpos frente a péptidos acetilados se evaluaron usando un kit no comercializado facilitado por Orgentec (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) en el que se proporcionaban placas de ELISA con cada uno de los péptidos conjugados por separado. Los dos péptidos acetilados incluidos en el kit presentan una secuencia de amino ácidos derivada de la vimentina mutada empleada en el ensayo MCV [292]. La arginina en la posición 7 del péptido de la vimentina mutada (GRVYATRSSAVR) se encuentra modificada para obtener los dos péptidos acetilados, uno de los cuales contenía una lisina acetilada (AcLys) y el otro una ornitina acetilada (AcOrn) en la misma posición [44,235].

3.3. GENERACIÓN DE ADUCTOS OXIDADOS CON MALONDIALDEHÍDO

3.3.1. Aductos de malondialdehído

Los anticuerpos frente a aductos de MDA se determinaron mediante un ELISA casero siguiendo el protocolo que se detalla en el trabajo original en el que se describen estos anticuerpos en pacientes con AR [33]. Como antígeno se utilizó albúmina bovina sérica modificada con malondialdehído *in vitro* (MDA-BSA) comercial (#20P-MD-BS110, Academy Bio-medical Company, Houston, Texas, USA).

3.3.2. Aductos de malondialdehído-acetaldehído

La determinación de anticuerpos frente a aductos de MAA se realizó empleando albúmina humana sérica (HSA) modificada *in vitro* químicamente en el laboratorio tal y como se describe a continuación. En primer lugar se obtuvo el malondialdehído en forma de sal de sodio, preparado en fresco siguiendo el protocolo descrito en Kikugawa *y col.* [293] con algunas modificaciones [294]. En una campana de extracción de gases se añadieron 5 mL de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en un matraz y sobre ese volumen se adicionaron lentamente 2.5 mL de 1 M ácido clorhídrico (HCl) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en una proporción molar de 1:1. El matraz se tapó, se selló con parafilm y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se dejó enfriar en hielo durante 15 minutos y se ajustó a pH 10 con 6 M hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) monitorizando el cambio de pH con un pHmetro Crison basic20 (Hach, Loveland, Colorado, USA). A continuación, se precipitó el malondialdehído con la adición de 100 mL de acetona fría dejando enfriar la mezcla durante 1 hora en hielo. Los cristales de malondialdehído se obtuvieron por filtración y se mantuvieron a -20 ºC durante 1.5 horas antes de su purificación mediante recristalización con agua-acetona en una proporción 1:1 en volumen (v/v). Tras su purificación, el malondialdehído purificado se dejó 24 horas en un desecador protegido de la luz para eliminar el líquido restante y se almacenó en estado sólido a -20 ºC protegido de la luz hasta un máximo de 1 semana.

La formación de aductos de MAA se llevó a cabo empleando HSA liofilizada (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA). La proteína (2 mg/mL) se incubó con 2 mM malondialdehído y 1 mM acetaldehído (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en un ratio molar de 2:1 (MAA-HSA) y en presencia de 2 mM ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y 2 mM ácido fítico (PA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en 0.1 M buffer fosfato pH 7.2 durante 72 horas a 37 ºC en tubos protegidos de la luz y sellados con parafilm. Simultáneamente se preparó un tubo con HSA en las mismas condiciones, pero en ausencia de malondialdehído y acetaldehído a modo de antígeno control (CTR-HSA). Además, se empleó otra fuente de HSA (Albunorm 5%) ya disuelta en disolución acuosa (Octapharma, Lachen, Switzerland) que se modificó de forma similar, pero empleando una concentración de 4 mM malondialdehído y manteniendo la concentración de acetaldehído en 1 mM (ratio molar 4:1). En este caso también se preparó un tubo con HSA a modo de control. Tras la reacción, las proteínas se dializaron en 0.1 M buffer fosfato pH 7.2 durante 24 horas a 4ºC con al menos tres cambios de buffer para eliminar los restos de aldehídos sin reaccionar, así como los ácidos incluidos en la reacción. Tras la diálisis, los aductos se concentraron empleando el sistema Amicon (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) usando filtros de 30 kDa como

punto de corte siguiendo las especificaciones del manual. Alternativamente, las proteínas se purificaron con el sistema Amicon en lugar de dializarse. De esta forma, se realizó la purificación y la concentración de los aductos de forma simultánea. Los posibles agregados proteicos formados durante la reacción se eliminaron mediante filtración a través de un filtro de 0.22 micras con membrana de polietersulfona (PES). Esta filtración esterilizó las preparaciones. Las proteínas se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, se utilizaron los aductos de forma inmediata, manteniéndose siempre a 4ºC y protegidos de la luz. En caso contrario, se almacenaron a -20 ºC protegidos de la luz hasta su uso.

3.4. GENERACIÓN DE ESPECIES CARBONILADAS DE COLÁGENO TIPO II

Las reacciones de carbonilación se realizaron empleando dos agentes oxidantes de distinta naturaleza química, el HOCl y la ribosa, siguiendo la metodología descrita previamente [30]. El HOCl es una especie altamente oxidante, con una cinética de reacción rápida, mientras que la ribosa es una especie oxidante más suave, con una cinética más lenta y cuyo mecanismo de reacción con las proteínas difiere del mecanismo del HOCl. Para la modificación con D-(-)-ribosa (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) se preparó un stock a 4 M en PBS pH 7.4 que se almacenó protegido de la luz a 4 ºC. Para la modificación con HOCl se preparó inmediatamente antes de su uso un stock a 10 mM en PBS pH 7.4 (100 mM monohidrógeno fosfato de sodio [Na_2HPO_4], 140 mM cloruro de sodio [NaCl], 3 mM cloruro de potasio [KCl]) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a partir de una solución concentrada de hipoclorito de sodio (NaOCl) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) [295]. La concentración del anión OCl^- se midió por espectrofotometría empleando el coeficiente de extinción molar a 292 nm (ε_{292}) de 350 M^{-1} cm^{-1} en la ecuación de la ley de Beer-Lambert [296]. El rango lineal en el que se puede aplicar la ecuación se determinó mediante diluciones seriadas de NaOCl en PBS pH 7.4, seleccionando la dilución 1:1000 como óptima al encontrarse en la zona intermedia del rango lineal. A continuación, se midió la absorbancia por triplicado de la dilución 1:1000 del NaOCl recien preparado en un espectrofotómetro Ultrospec 1100pro (Amershan Biosciences, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) obteniendo la concentración del ión OCl^- a pH 7.4. Este pH es necesario porque dependiendo del pH el anión OCl^- se encuentra formando diferentes especies en disolución acuosa: a pH ácido forma mayoritariamente HOCl mientras que a pH básico se encuentra disociado en su forma aniónica. La constante de disociación ácida (K_a) del HOCl es de 7.5 [297] por lo que según la ecuación de esta constante (ecuación 1), a pH 7.4 se puede asumir que la concentración de las especies HOCl y OCl^- que se encuentran en disolución es idéntica (ecuación 3). Por lo tanto, la concentración obtenida espectrofotométricamente de la especie OCl^- a pH 7.4 es equivalente a la concentración de HOCl.

$$K_a = \frac{[H^+]\cdot[OCl^-]}{[HOCl]} \qquad \text{(ecuación 1)}$$

Si aplicamos el $-\log_{10}$ a los dos términos de la ecuación:

$$pK_a = \frac{pH\cdot(-\log[OCl^-])}{(-\log[HOCl])} \qquad \text{(ecuación 2)}$$

Si pH ≈ pK_a entonces:

$$[HOCl] \approx [OCl^-] \qquad \text{(ecuación 3)}$$

La carbonilación se realizó sobre colágeno tipo II (CII) comercial liofilizado y de alta pureza obtenido a partir de cartílago bovino (#804001, MDbioproducts, Oakdale, Minnesota, USA). En primer lugar, el CII se reconstituyó según las instrucciones del proveedor en 50 mM ácido acético durante 24 horas a 4 ºC en condiciones estériles y se almacenó protegido de la luz a 4 ºC. Posteriormente se prepararon alícuotas en PBS pH 7.4 en condiciones estériles y se almacenaron a -20 ºC hasta su uso. El CII carbonilado se obtuvo mediante su reacción (2 mg/mL en PBS pH 7.4) con 1 mM HOCl preparado en fresco a partir del stock a 10 mM (HOCl-CII), o con 2 M ribosa a partir del stock a 4 M (GLI-CII). Estas reacciones se incubaron durante 24 horas a 37 ºC en condiciones estériles y en oscuridad. En paralelo se incubó CII en ausencia de los agentes carbonilantes para emplearlo como antígeno control (CTR-CII). También se modificó BSA (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en las mismas condiciones que el CII para un uso comparativo [30]. Tras las reacciones, los preparados se dializaron en PBS pH 7.4 a 4 ºC durante 24 horas con al menos tres cambios de PBS. La concentración de las proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA) según las instrucciones del fabricante y los antígenos se utilizaron a continuación manteniéndolos a 4 ºC y protegidos de la luz.

3.5. GENERACIÓN DE PROTEÍNAS NITRADAS

La reacción de nitración para producir 3-nitrotirosina (3-NT) se realizó sobre alícuotas de las mismas preparaciones de PS empleadas para la reacción de homocisteinilación. En primer lugar, las PS se diluyeron a 3-5 mg/mL en PBS 1X y se ajustaron a pH 3.5 utilizando 6 M y 0.6 M ácido acético. A continuación, se añadió 10 mM peroxinitrito de sodio ($NaONO_2$) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA), concentración determinada como óptima en experimentos previos y se dejó reaccionar durante 24 h a 37 ºC [35] para obtener PS nitradas (3-NT-PS). Se incubó además una muestra de PS sin el agente nitrante para obtener antígeno control (CTR-PS). También se nitró suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para usar como control de la reacción de nitración. Las proteínas se filtraron con un sistema Amicon (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) usando filtros de 3 kDa para las PS y de 30 kDa para el FBS a 5000 rpm durante 30 min y a 4 ºC para eliminar el $NaONO_2$ sin reaccionar y otros subproductos de la reacción. Posteriormente se realizó el cambio de buffer de las proteínas por PBS 1X pH 9, se centrifugaron como se indica anteriormente y se almacenaron a -20 ºC tras determinar su concentración usando el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

3.6. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS NITRADOS Y NATIVOS

La determinación de anticuerpos anti-Nitra que reconocen la 3-NT también se realizó empleando péptidos nitrados en lugar de proteínas completas, como ya se ha hecho en un estudio previo [278]. Los péptidos se seleccionaron a partir de proteínas descritas como relevantes en la AR. La búsqueda se centró en proteínas con un peso molecular en el rango de 20-80 kDa ya que se han observado residuos nitrados en proteínas sinoviales de ese rango aisladas de pacientes con AR [28]. Además, considerando que la nitración *in vivo* ocurre

principalmente en los residuos de tirosina sólo se seleccionaron péptidos que contenían tirosinas susceptibles de ser nitradas. Para la selección de péptidos se emplearon dos programas informáticos que predicen los sitios en los que existe mayor probabilidad de encontrar tirosinas nitradas: el programa iNitro-Tyr [298] y el programa GPS-YNO2 1.0 [299], ambos disponibles de forma gratuita. Se consideró que la predicción era de confianza cuando aparecía el mismo sitio con la tirosina nitrada en ambos programas y además ese sitio presentaba un valor $\Delta > 0.5$ en iNitro-Tyr y una puntuación > 1.0 para un umbral medio en GPS-YNO2, parámetros cuyo valor es directamente proporcional a la probabilidad de encontrar 3-NT en un sitio específico. En total se seleccionaron 10 péptidos con una longitud de 21 residuos basándonos en hallazgos previos [300]. La secuencia de los péptidos se seleccionó de forma que la posición de la 3-NT se encontraba en el medio de la secuencia de aminoácidos. Se sintetizaron en una versión nativa y otra nitrada en un único residuo de tirosina. Todos se sintetizaron biotinilados en el extremo amino terminal por Schafer-N (Copenhagen, Denmark) con una pureza superior al 80%. Dos péptidos nitrados, uno derivado de la peoteína BiP y otro de la tenascina, no se obtuvieron con la suficiente pureza y fueron descartados del estudio junto con los péptidos nativos correspondientes. La Tabla 5 muestra las características de los péptidos, así como los valores de los parámetros indicativos de la probabilidad de nitración obtenidos de cada programa.

Tabla 5. Péptidos derivados de proteínas relevantes en la AR que contienen una tirosina susceptible de encontrarse nitrada *in vivo*. Las secuencias de los péptidos nitrados en los residuos de tirosina (3-NO_2-Y) se muestran desde el extremo amino hacia el carboxilo terminal indicando la posición en la proteína del péptido. Los péptidos nativos contienen una tirosina (Y) en la misma posición que la 3-NO_2-Y en la versión nitrada. El parámetro Δ se obtiene del programa iNitro-Tyr mientras que el programa GPS-YNO2 1.0 proporciona la puntuación indicada en la última columna. Cuanto mayor es el valor de cualquiera de estos parámetros mayor es la probabilidad de nitración.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Pureza (%) nitrado/nativo	Δ	Puntuación
Enolasa 1	$_{247}$AASEFFRSGK(3-NO_2-Y)DLDFKSPDDP$_{267}$	>90 / >90	0.999	2.881
Enolasa 2	$_{34}$AVPSGASTGI(3-NO_2-Y)EALELRDNDK$_{54}$	>85 / >90	0.584	1.498
Fibrinógeno	$_{312}$GKNYCGLPGE(3-NO_2-Y)WLGNDKISQL$_{332}$	>90 / >95	0.903	1.611
Vimentina	$_{20}$TASRPSSSRS(3-NO_2-Y)VTTSTRTYSL$_{40}$	>90 / >87	0.963	2.693
14-3-3 η	$_{206}$AELDTLNEDS(3-NO_2-Y)KDSTLIMQLL$_{226}$	>90 / >90	1.061	1.695
BiP	$_{165}$VTHAVVTVPA(3-NO_2-Y)FNDAQRQATK$_{185}$	>66 / >90	3.237	2.824
Tenascina	$_{1676}$DITGLREATE(3-NO_2-Y)EIELYGISKG$_{1696}$	>46 / >90	0.457	0.912
Histona H3	$_{32}$ATGGVKKPHR(3-NO_2-Y)RPGTVALREI$_{52}$	>90 / >90	1.319	1.679
Histona H4 1	$_{63}$LENVIRDAVT(3-NO_2-Y)TEHAKRKTVT$_{83}$	>90 / >90	0.731	1.866
Histona H4 2	$_{42}$GGVKRISGLI(3-NO_2-Y)YEETRGVLKVF$_{62}$	>90 / >80	0.546	1.448

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7. GENERACIÓN DE PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS

La homocisteinilación se llevó a cabo mediante la reacción del hidrocloruro de L-homocisteína tiolactona (L-Hci-tiolactona) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) con proteínas extraídas de tejido sinovial (PS). Las muestras de tejido sinovial se recolectaron de tres pacientes con artrosis durante operaciones de reemplazo de la articulación de la rodilla realizadas en el Hospital Provincial de Conxo o en el Hospital Clínico Universitario de Santiago, ambos en Santiago de Compostela. Esta parte del estudio también fue aprobada por el Comité Ético de Investigación de Galicia y se contó con el consentimiento informado por escrito de los pacientes. La sinovia se diseccionó del tejido conectivo y se homogeneizó empleando un equipo Polytron PT 1200 E (Kinematica AG) mediante la adición de buffer lisis (1 mM ortovanadato de sodio [Na_3VO_4], Tritón X-100 1X, 50 mM tris(hidroximetil)aminometano-HCl [Tris-HCl], 250 mM NaCl, 30 mM pirofosfato de sodio [$Na_4P_2O_7$], 5 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], 100 mM fluoruro de sodio [NaF], 1 mM ditiotreitol [DTT], cóctel inhibidor de proteasas [PIC] 1X) empleando 3 mL por miligramo de tejido sinovial. Posteriormente las preparaciones se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 10000 x g a 4 ºC. Las PS se recogieron del sobrenadante, se determinó su concentración mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA) y se almacenaron en alícuotas a -80 ºC.

La concentración de las PS se ajustó a 10 mg/mL en 0.05 M buffer fosfato de potasio pH 7.4 con 0.2 mM EDTA antes de la adición de 1 mM L-Hci-tiolactona, concentración determinada como óptima para la homocisteinilación en experimentos previos. La reacción se llevó a cabo durante 16 h a 37 ºC [285] para generar PS N-ε-homocisteiniladas (Hci-PS). En paralelo se incubó una muestra de PS siguiendo la metodología anterior, pero en ausencia de L-Hci-tiolactona para su uso como antígeno control (CTR-PS). También se modificó HSA de forma similar a las PS pero empleando 0.4 mM L-Hci-tiolactona (Hci-HSA) [285,287], concentración a la cual se generó un nivel de homocisteínas similar al observado en las PS. La Hci-HSA se utilizó como proteína control de la modificación. Las preparaciones se filtraron mediante un sistema Amicon (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) usando filtros de 3 kDa como punto de corte para las PS y de 30 kDa para la HSA a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 min y a 4 ºC para eliminar la L-Hci-tiolactona sin reaccionar. Finalmente, se cambió el buffer de las proteínas por PBS 1X pH 9, se centrifugaron de nuevo como se ha descrito y se midió su concentración con el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA) antes de almacenarse a -20 ºC.

4. VERIFICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

Tras la generación de las modificaciones postraduccionales mencionadas en la sección anterior se procedió a verificar la correcta formación de las estructuras correspondientes a cada modificación. En la Tabla 8 aparece un breve resumen de los protocolos utilizados para la caracterización de la formación de las estructuras correspondientes a cada modificación postraduccional. Además, en casos seleccionados se modificó y se caracterizó una proteína estándar a modo de control de calidad de la reacción.

Tabla 6. Metodología empleada en la verificación de la formación de las estructuras correspondientes para cada modificación postraduccional estudiada. *m/z* = relación masa/carga, hexil-MAA = 1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldeído, ^{1}H-RMN = resonancia magnética nuclear de protón, λexc = longitud de onda de excitación, Abs.máx = absorbancia máxima de medición, PTP = productos de tipo pentosidina, AGEs = productos de glicación avanzados. El resto de abreviaturas están disponibles en la Tabla 3. * Estas determinaciones han sido realizadas por los proveedores

Antígeno modificado	Técnicas	Parámetros	Resultado	Ref.
c(péptido)	Espectrometría de masas*	-	Cambio *m/z* modificado *vs.* control indicativo de la presencia de citrulina	
Ac(aminoácido)	Espectrometría de masas*	-	Cambio *m/z* modificado *vs.* control indicativo de la presencia de lisina/ornitina acetilada	
MAA-HSA	Fluorescencia	Estándar hexil-MAA caracterizado por ^{1}H-RMN Estructura MAA: λexc = 398 nm	Curva calibrado con hexil-MAA para calcular ratio modificado *vs.* control indicativo de formación de MAA	32,294
HOCl-CII y GLI-CII	SDS-PAGE	4%-8% condiciones reductoras	Cambio migración y patrón de bandas informativo de la integridad estructural y del peso molecular	30
	Fluorescencia	Triptófano: λexc = 295nm PTP: λexc = 335 nm AGEs: λexc = 370 nm	Ratio modificado *vs.* control indicativo de pérdida de estructura (triptófano), formación de PTP, formación de AGEs	
	Espectrofotometría	Abs.máx = 370 nm	Nivel de grupos carbonilo	
3-NT-PS	Fluorescencia	Estándar 3-NT comercial: λexc = 275 nm	Pérdida de tirosina	35,301
	Espectrofotometría	Estándar 3-NT comercial: Abs.máx = 420 nm	Nivel de tirosina nitrada	
	Inmunoensayo	Comercial	Nivel de tirosina nitrada	
3-NT-(péptido)	Espectrometría de masas*	-	Cambio *m/z* modificado *vs.* control indicativo de la presencia de tirosina nitrada	
Hci-PS	Inmunoensayo	Comercial	Nivel de homocisteína	302

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1. VERIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS

Los péptidos citrulinados, nitrados y nativos se sometieron al control de calidad establecido por las empresas que los sintetizaron y sólo se emplearon aquellos que pasaron satisfactoriamente los umbrales de calidad fijados. La pureza se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cuyo perfil de migración mostró un pico mayoritario por cada péptido. El área bajo el pico mayoritario es una medida indicativa de la pureza del péptido tras la separación. Posteriormente, los péptidos purificados por HPLC se analizaron mediante espectrometría de masas registrando los espectros, que son característicos de la composición de aminoácidos de cada péptido y que mostraron un pico mayoritario para cada péptido.

4.2. VERIFICACIÓN DE LA ADUCCIÓN CON MALONDIALDEHÍDO Y ACETALDEHÍDO

4.2.1. Ensayo de fluorescencia

La verificación de la formación de MAA-HSA se evaluó mediante el análisis del espectro de emisión de fluorescencia. Para ello fue necesario producir un estándar: 1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldehído, a partir de ahora denominado hexil-MAA, que es un análogo estructural del compuesto mayoritario presente en las proteínas tras la formación de aductos de MAA sobre las lisinas. Su obtención se llevó a cabo mediante síntesis química siguiendo el protocolo descrito previamente [240]. En una campana de gases se añadieron a un matraz de fondo redondo 20 mL de 1 M de la sal de sodio de malondialdehído y 2.13 mL de hexilamina (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) y tras ajustar a pH 4 con 12 M HCl se añadieron 0.56 mL de acetaldehído. La reacción se mantuvo a 50 ºC en agitación durante 4 horas. Tras la reacción se eliminó el exceso de disolvente utilizando un Savant SpeedVac SPD111V (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) antes de proceder a la purificación del hexil-MAA por cromatografía en columna.

La cromatografía se realizó en una columna de tamaño intermedio empleando gel de sílice 200-400 mesh 60 Å y como eluyente una mezcla de 1:9 (v/v) metanol-cloroformo. Se recogieron diferentes fracciones que se analizaron mediante cromatografía en capa fina para determinar en cuál de ellas se encontraba el hexil-MAA a partir de su valor de relación de frentes (Fr) de 0.73 [240]. Este valor se corresponde con la relación entre la distancia que recorre un compuesto y la distancia que recorre el eluyente y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas. Las fracciones en las que se verificó la presencia del hexil-MAA se juntaron para su posterior purificación por recristalización con 95% etanol dejando precipitar durante 24 horas a -20 ºC en oscuridad. Finalmente el hexil-MAA se filtró, se secó en un desecador durante otras 24 horas y se almacenó como sólido protegido de la luz a temperatura ambiente.

La caracterización del hexil-MAA se realizó mediante resonancia magnética nuclear de protón (^{1}H-RMN). El espectro de ^{1}H-RMN muestra los desplazamientos químicos (δ) de los diferentes hidrógenos presentes en el compuesto en relación con un compuesto estándar, siendo característico de cada sustancia en unas condiciones de medición determinadas. Para su comparación con datos bibliográficos [240] el hexil-MAA (5 mg) se disolvió en cloroformo deuterado y se registró el espectro a 300 MHz empleando un espectrómetro Varian Mercury

300 (Varian Inc., Palo Alto, California, USA) disponible en el servicio de Resonancia Magnética Nuclear de La Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT). El tetrametilsilano se utilizó como estándar de referencia frente al que comparar los valores de δ (TMS; δ = 0.0).

La correcta formación de aductos de MAA en la HSA se verificó siguiendo un procedimiento descrito anteriormente [294]. En primer lugar, se disolvió el hexil-MAA en 0.1 M buffer fosfato pH 7.2 a una concentración stock de 20 mg/mL a partir del cual se preparó una curva estándar de diluciones seriadas 1:2. La MAA-HSA y la CTR-HSA se diluyeron hasta 1 mg/mL y se verificó que a esa concentración su absorbancia a la longitud de onda de las medidas de fluorescencia (470 nm) era inferior a 0.1 antes del ensayo de fluorescencia. En una placa Costar de 96 pocillos negra (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) se añadieron por duplicado 50 uL de cada dilución de la curva estándar así como 50 uL de la HSA modificada y control. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 4 ºC en un fluorímetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, Danaher, Washington D.C., USA) utilizando como blanco 0.1 M buffer fosfato pH 7.2. Primero se determinó la longitud de onda de máxima emisión de los aductos MAA excitando la MAA-HSA a 398 nm y recogiendo el espectro de emisión entre 360 y 600 nm. A continuación, se midió la fluorescencia de los diferentes puntos de la curva estándar y de la HSA tanto modificada como control a la longitud de onda de máxima emisión en unidades de fluorescencia relativas (RFU). Para determinar la cantidad de moléculas fluorescentes formadas en la HSA modificada se aplica la ecuación 1 [294]:

$$\text{Unión fluorescente} = \frac{F_{\frac{398\ \text{nm}}{\lambda\ \text{máx. em}}}(\text{RFU})}{k\left(\frac{\text{RFU}}{\text{nmol}^{-1}\cdot\text{L}}\right)} \cdot \frac{\text{Factor dilución proteína}}{c\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)} \quad \text{(ecuación 1)}$$

siendo k una constante cuyo valor se obtiene de la pendiente de la recta construida mediante una regresión lineal de la representación gráfica de los datos de intensidad de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (RFU) a 470 nm (eje ordenadas) de las diferentes concentraciones de la curva estándar del hexil-MAA en nmoles/L (eje abscisas), $F_{398/\lambda\ \text{máx.em.}}$ la intensidad de fluorescencia emitida (RFU) a la longitud de onda de máxima emisión fijando la longitud de onda de excitación a 398 nm y c la concentración de la proteína en la muestra en el momento de la medición.

Una vez calculada la unión fluorescente, el ratio de modificación o aducción de la proteína se calculó empleando la ecuación 2. Este ratio toma un valor de al menos 1 si la proteína se ha modificado correctamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$\text{Ratio}\ \frac{F}{M} = \frac{\text{unión fluorescente}\left(\frac{\text{nmoles}}{\text{mg}}\right)}{\text{proteína}\left(\frac{\text{nmoles}}{\text{mg}}\right)} \quad \text{(ecuación 2)}$$

4.3. COMPROBACIÓN DE LA CARBONILACIÓN CON HOCL Y RIBOSA

4.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La modificación de las proteínas después de la reacción de carbonilación con el HOCl y la ribosa se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. El CII (1 μg) y la BSA (5 μg) tanto modificados como nativos se diluyeron en buffer de carga con un agente reductor y se llevaron a ebullición a 98 ºC durante 5 minutos antes de cargarse en el gel. La electroforesis de las muestras se llevó a cabo empleando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 8%. El voltaje aplicado cuando las muestras se encontraban en el gel concentrador fue de 70 V durante 1 hora mientras que en el gel separador se aplicó un voltaje de 100 V durante 3 horas. A continuación, se tiñeron los geles con una disolución de Brilliant Blue G solution (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) durante 1 hora en constante agitación. Tras el lavado con una disolución de metanol-ácido acético-agua en una proporción 25:5:70 (v/v/v) se capturaron las imágenes con un ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

4.3.2. Ensayo de fluorescencia

La carbonilación de proteínas produce cambios estructurales debido a la formación de productos de tipo pentosidina (PTP) y de AGEs, algunos de los cuales tienen propiedades fluorescentes que no se encuentran en la proteína nativa [266]. Además, la modificación química de los aminoácidos también provoca cambios conformacionales mediante la ruptura de interacciones electrostáticas, de puentes de hidrógeno o por impedimento estérico, lo que en su conjunto altera las propiedades fluorescentes de las proteínas. Los cambios conformacionales pueden estudiarse a través de los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca de las proteínas, debida principalmente a los residuos de triptófano [303]. Para evaluar los cambios producidos en el CII y la BSA se registró la fluorescencia de las proteínas modificadas y control empleando un espectrofotómetro de fluorescencia F-2500 FL (Hitachi, Chiyoda, Tokio, Japón) disponible en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela. Las proteínas se colocaron en cubetas de cuarzo y se excitaron a las longitudes de onda de 295, 335 y 370 nm [304,305] realizando previamente un blanco con PBS pH 7.4 para cada longitud de onda de excitación. La excitación a 295 nm es específica de los residuos de triptófano, con una contribución mínima a la fluorescencia de emisión de los aminoácidos tirosina y fenilalanina [306]. La determinación de PTP se realizó utilizando una longitud de onda de excitación de 335 nm [304,307–311] mientras que para la determinación de AGEs se empleó una longitud de excitación de 370 nm [304,308,312,313]. Los espectros de emisión de fluorescencia se recogieron en el rango de 230 a 600 nm para cada longitud de onda de excitación y así determinar la longitud de onda de máxima emisión. La intensidad de fluorescencia de las proteínas a la longitud de emisión máxima se registró en unidades de fluorescencia relativas (FRU), valores que se transformaron en RFU por miligramo (RFU/mg) teniendo en cuenta la concentración de la proteína en el momento de la lectura. El grado de carbonilación en términos de formación de PTP y de AGEs se evaluó mediante el ratio de la intensidad de fluorescencia (RFU/mg) de la proteína modificada y la proteína control específica para cada estructura.

4.3.3. Cuantificación de grupos carbonilo mediante el ensayo con 2,4-dinitrofenilhidrazina

La reacción del HOCl o la ribosa con los aminoácidos de las proteínas da lugar a la formación de nuevos grupos carbonilo que pueden ser cuantificados de forma indirecta a través de su derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH). En la reacción de derivatización, un grupo carbonilo proveniente de un aldehído o una cetona reacciona con el nitrógeno del grupo hidracina del DNPH para formar dinitrofenilhidrazonas que presentan propiedades espectroscópicas en el espectro visible. La cuantificación de carbonilos en el CII y en la BSA tanto modificados como control se realizó según el procedimiento descrito [314] con algunas modificaciones [315]. Se precipitaron 250 µg de proteína por duplicado con 10% ácido tricloroacético (TCA) concentración final en hielo durante 5 minutos. Tras centrifugar a 14000 rpm a 4 ºC durante 10 minutos los precipitados se resuspendieron en 50 µL de 5% SDS. A continuación, se añadieron 200 µL de 10 mM DNPH disuelto en 2.5 M HCl y 0.5 M ácido ortofosfórico (H_3PO_4). Esta reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, mezclando con un agitador de vórtice cada 10 minutos para favorecer la derivatización. Las proteínas se precipitaron con 250 µL de 20% TCA frío durante 5 min en hielo seguido de centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a 4 ºC. Tras repetir este paso con 250 µL de 10% TCA frío, los precipitados se lavaron 3 veces con 250 µL de etanol-acetato de etilo en una proporción 1:1 (v/v) y se centrifugaron como se menciona anteriormente para eliminar los restos de DNPH libre sin reaccionar. Los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente, se resuspendieron en 500 µL de 6 M guanidina-HCl pH 2.5 y se centrifugaron de nuevo a 14000 rpm a 4 ºC durante 10 minutos para eliminar cualquier resto insoluble antes de realizar la lectura de absorbancia. En una placa de 96 pocillos con el fondo plano se añadieron por duplicado 220 µL de cada proteína y se registró la absorbancia a 370 nm en un lector de placas Epoch2 (BioTek, Winooski, Vermont, USA) usando como blanco 6 M guanidina-HCl pH 2.5. Los resultados se expresaron como nanomoles de grupos carbonilo por miligramo de proteína (nmol/mg) empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Grupos carbonilo } \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg}}\right) = \frac{\text{OD proteína - OD blanco}}{\varepsilon_{370}\ \left(\text{mL}\cdot\text{nmol}^{-1}\right)\cdot\ \text{c}\ \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

siendo OD la densidad óptica de la proteína o del blanco a 370 nm, ε_{370} el coeficiente de extinción molar del complejo proteína-hidrazona (22.000 M^{-1} cm^{-1}) [314] ajustado al paso de luz del pocillo [316] (0.011 $mL\cdot nmol^{-1}$) y c la concentración de la proteína.

4.4. VERIFICACIÓN DE LA NITRACIÓN CON PEROXINITRITO DE SODIO

4.4.1. Ensayo espectrofotométrico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las propiedades espectrofotométricas de la 3-NT generada tras la reacción de nitración difieren de las de la tirosina sin modificar, lo que resulta de utilidad para evaluar la modificación de las proteínas. La 3-NT presenta un máximo de absorción a 420 nm cuando se encuentra en un entorno básico (pH > 9) mientras que la tirosina sin modificar carece de

absorción a esa misma longitud de onda [35]. Para evaluar la presencia o ausencia de 3-NT se registraron los espectros de absorbancia en el rango de 250 a 500 nm de las PS modificadas y control empleando un espectrofotómetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, Danaher, Washington D.C., USA). Como blanco para las mediciones se usó PBS 1X a pH 9. Los niveles de 3-NT en las PS se determinaron mediante la interpolación de los valores de absorbancia a 420 nm de las muestras en una recta patrón realizada con diluciones seriadas de concentración conocida de 3-NT comercial (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) preparadas en PBS 1X a pH 9 [35]. Las proteínas y las diluciones de la recta patrón (200 µL) se analizaron por duplicado utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano para medir la OD a 420 nm. La interpolación de los valores de OD en el rango lineal de la recta patrón proporcionó el nivel de 3-NT expresado como microgramos por miligramo de proteína (µg 3-NT/mg) [35]. Las PS no mostraron un pico bien definido a 420 nm en su espectro de absorbancia, por lo que la determinación del nivel de 3-NT también se realizó empleando el ensayo 3-Nitrotyrosine ELISA Kit comercial (#ab116691, Abcam, Cambridge, UK) según las instrucciones del fabricante.

4.4.2. Ensayo de fluorescencia

La presencia de 3-NT también se verificó aprovechando la gran pérdida de la fluorescencia debida a la tirosina que se produce como consecuencia de su nitración [301]. Las proteínas se colocaron en cubetas de cuarzo y se excitaron a 275 nm tras realizar un blanco con PBS 1X a pH 9. Los espectros de emisión se registraron en el rango de 360 a 450 nm empleando un equipo SpectraMax M2 (Molecular Devices, Danaher, Washington D.C., USA). La intensidad de fluorescencia de las preparaciones a la longitud de emisión máxima se registró en unidades de fluorescencia relativas (FRU) y se empleó para la comparación directa de las proteínas modificadas y control.

4.5. EVALUACIÓN DE LA HOMOCISTEINILACIÓN CON HIDROCLORURO DE L-HOMOCISTEÍNA TIOLACTONA

El nivel de homocisteína (Hci) tras la modificación de las proteínas se determinó en las proteínas tanto modificadas como control con el ensayo Immulite 200 homocysteine (#L2KHO2, Siemens, Erlangen, Germany) acreditado para su uso en la práctica clínica utilizando un equipo Immulite 2000 system (Siemens, Erlangen, Germany). El ensayo emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la S-adenosil-L-homocisteína (SAH), una forma reducida enzimáticamente de la L-homocisteína. Los niveles de L-homocisteína se expresaron en nanomoles de Hci por miligramo de proteína (nmol Hci/mg). Las determinaciones se realizaron por el Laboratorio Central del Hospital Clínico Universitario de Santiago.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS CLÁSICOS DE LA AR: FACTOR REUMATOIDE Y ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS

La evaluación de los anticuerpos anti-CCP y del FR se realiza de manera rutinaria en la práctica clínica. Los anticuerpos anti-CCP se determinaron empleando diferentes kits comerciales que capturan anticuerpos frente a péptidos cíclicos citrulinados (CCPs). En el Hospital Clínico Universitario de Santiago se empleó el kit EDIA anti-CCP assay (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden) que utiliza antígenos de segunda generación (CCP2) y cuyo punto de corte para definir pacientes positivos es >5 unidades arbitrarias (UA)/mL. En el Hospital Universitario La Paz y en el Hospital Universitario La Princesa se utilizó el Immunoscan CCPlus (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden), también CCP2 con un punto de corte >50 UA/mL. Las muestras recogidas en el Hospital Universitario La Princesa con fecha posterior a octubre de 2010 se analizaron con el kit QUANTA Lite CCP3.1 IgG/IgA (Inova Diagnostics, Inc. San Diego, California, USA) que emplea antígenos de tercera generación (CCP3) y cuyo punto de corte es >40 UA/mL. El FR de isotipo IgM se determinó por nefelometría con un punto de corte de >20 UA/mL para definir la positividad.

6. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A NUEVAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

La determinación de anticuerpos en el suero de pacientes y controles se realizó mediante ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilizando diferentes tipos de placas. Para las proteínas se emplearon placas de ELISA de 96 pocillos con fondo plano Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Estas placas también se emplearon al analizar la reactividad frente al péptido cíclico de la enolasa CEP-1. En cambio, la reactividad frente a péptidos biotinilados citrulinados, nitrados y nativos se evaluó usando placas de 96 pocillos de alta capacidad de unión que están cubiertas de estreptavidina y tienen fondo plano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Las placas de ELISA para la determinación de anticuerpos frente a péptidos acetilados, así como los controles positivo y negativo, la curva de calibrado, los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) y el resto de los reactivos necesarios fueron cedidos por Orgentec (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) pero no están disponibles de forma comercial. Todos los anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas humanas conjugados con la fosfatasa alcalina (AP) se produjeron en cabra y se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridge, UK). La lectura de la OD de las placas se realizó a 405 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima AP y a 450 nm para los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP empleando un lector de placas Epoch2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Para la AP se empleó como sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) disuelto en buffer dietanolamina 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La lectura de la OD de las placas se realizó tras 30 min de incubación del sustrato excepto en los casos indicados.

Las condiciones de cada ELISA casero variaron en función de la modificación postraduccional frente a la cual se determinaron los anticuerpos de acuerdo con la metodología publicada y con las variaciones introducidas en la puesta a punto con el objetivo de aumentar la sensibilidad del ensayo. En la Tabla 7 se recogen los parámetros más relevantes de cada ELISA empleado en este trabajo. Los protocolos de ELISA específicos para cada autoanticuerpo se detallan en el apartado correspondiente.

Todas las determinaciones de anticuerpos incluyeron sueros de pacientes y controles analizados por duplicado. En una misma placa se evaluaron tanto sueros de pacientes como de controles para evitar posibles sesgos en las determinaciones. Además, se empleó el mismo lote de proteína modificada y proteína control para evitar posibles sesgos derivados de la preparación del antígeno. En cada placa se incluyó también un control positivo y un control negativo específicos para cada antígeno modificado y para cada isotipo de anticuerpo secundario obtenidos de los análisis previos de reactividad, así como un blanco. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo con un valor < 15% se consideraron aceptables. En los ensayos ELISA para los anticuerpos anti-cH4/39-40, anti-MAA y anti-MDA se incluyeron en cada placa dos diluciones de la curva de calibrado construida a partir de diluciones seriadas de una mezcla de sueros positivos que presentaban una reactividad elevada para cada anticuerpo secundario y para cada PTM como punto de control adicional para evaluar posibles sesgos en las determinaciones a lo largo del tiempo. La OD específica de cada PTM se calculó restando el valor obtenido para la proteína no modificada del valor obtenido para la proteína modificada. Las OD específicas se transformaron en títulos de anticuerpo expresados como UA tras su interpolación en una curva de calibrado como se detalla en la sección de análisis estadístico. La reactividad frente a CII carbonilado, PS nitradas, péptidos nitrados y PS homocisteiniladas se analizó empleando las OD en lugar de utilizar títulos de anticuerpos tal y como han hecho los trabajos previos [35,37,38].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Parámetros de los ELISA empleados para la determinación de anticuerpos frente a modificaciones postraduccionales. Anti-CCP: anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados, anti-CarP: anticuerpos anti-proteínas carbamiladas, anti-péptidos citrulinados: anticuerpos frente a los péptidos citrulinados incluidos en la Tabla 4, anti-péptidos acetilados: anticuerpos frente a un péptido derivado de MCV con lisina acetilada u ornitina acetilada en la posición 7, anti-MAA: anticuerpos anti-malondialdehído-acetaldehído, anti-MDA: anticuerpos anti-malondialdehído, anti-Carbo: anticuerpos anti-proteíans carboniladas, anti-Nitra: anticuerpos anti-proteínas/péptidos nitrados, anti-Hci: anticuerpos anti-proteínas homocisteiniladas. MCV = vimentina mutada citrulinada. AP = fosfatasa alcalina. HRP = peroxidasa de rábano. Anti-IgG (H+L) = anticuerpo frente a las cadenas pesadas y ligeras de las IgG humanas, anti-IgG Fcγ = anticuerpo frente a la región Fc de la cadena γ específica de IgG humana, anti-IgM 5μ Fc = anticuerpo frente a la región 5μ Fc específica de IgM humana, anti-IgA cadena α = anticuerpo frente a la cadena α específica de IgA humana, $(Fab')_2$ anti-IgG = anticuerpo frente a IgG humana compuesto únicamente por la región $(Fab')_2$. *Los reactivos para estos ELISA fueron cedidos por la casa comercial pero todavía no se comercializan.

Anticuerpo	Tipo ELISA	Antígeno modificado	Antígeno control	Bloqueo	Dilución suero	Anticuerpo secundario	Dilución Ab 2º	Punto de corte
Anti-CCP	comercial	CCP2	-	-	1:100	Anti-IgG-AP	-	>5 UA/mL
Anti-CarP	casero	CarP-FBS	CTR-FBS	1% BSA	1:50	Anti-IgG (H+L)-AP	1:5000	Percentil 98
Anti-péptidos citruilnados	casero	cH4/39-40	H4/39-40	2% BSA	1:100	Anti-IgG (H+L)-AP	1:5000	Media+2DS
	casero	cFibβ36-52	-	2% BSA	1:50	Anti-IgG (H+L)-AP	1:10000	Media+2DS
	casero	cFibα27-43, CEP-1, cVim60-75, cVim2-17	-	2% BSA	1:100	Anti-IgG (H+L)-AP	1:10000	Media+2DS
Anti-péptidos acetilados	comercial*	AcLys, AcOrn	-	BSA	1:100	Anti-IgG-HRP	-	Percentil 98
Anti-MAA	casero	MAA-HSA	CTR-HSA	2% BSA	1:100	Anti-IgG (H+L)-AP Anti-IgM 5μ Fc-AP Anti-IgA cadena α-AP	1:5000 1:8000 1:1000	Percentil 98
Anti-MDA	casero	MDA-BSA	CTR-BSA	3% BSA	1:100	$(Fab')_2$ anti-IgG (H+L)-AP Anti-IgM 5μ Fc-AP	1:1000 1:2000	Percentil 98
Anti-Carbo	casero	HOCl-CII, GLI-CII	CTR-CII	2% leche	1:100	Anti-IgG Fcγ-AP	1:2000	-
Anti-Nitra	casero	3-NT-PS	CTR-PS	1% BSA	1:100	$(Fab')_2$ anti-IgG (H+L)-AP	1:10000	-
	casero	Mezcla 3-NT-pep	Mezcla CTR-pep	1% BSA	1:100	Anti-IgG (H+L)-AP	1:5000	-
Anti-Hci	casero	Hci-PS	CTR-PS	0.5% gelatina	1:200	$(Fab')_2$ anti-IgG (H+L)-AP	1:5000	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1. ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CARBAMILADAS

Los datos de anti-CarP para los pacientes del Hospital Clínico Universitario de Santiago, del Hospital Universitario La Paz y del Hospital Universitario La Princesa estaban disponibles de estudios previos realizados por nuestro grupo [70,176]. Estos anticuerpos se determinaron con el ELISA casero que emplea como antígeno suero fetal de ternero (FBS) carbamilado *in vitro* (CaFBS). Brevemente, se añadieron 50 µL por pocillo de CaFBS o de FBS no modificado a una concentración de 10 µg/mL en buffer 0.1 M carbonato pH 9.6 a placas de 96 pocillos con el fondo plano Nunc Maxisorp y se incubaron toda la noche a 4ºC en agitación. Se realizaron 3 lavados con 200 µL de PBS-Tween20 0.05% (PBS-T) antes de bloquear con 100 µL por pocillo de 1% BSA en PBS (1% BSA+PBS) durante 6 h a 4ºC en agitación. Tras un paso de lavado se añadieron 50 µL de suero diluido 1:50 en 1% BSA+PBS-T. Las placas se incubaron en hielo durante toda la noche, se lavaron 3 veces con PBS-T y a continuación se añadieron 50 µL del anticuerpo secundario frente a IgG humana (cadenas pesadas y ligeras, H+L, #109-055-003) conjugado con AP a una dilución 1:5000 en 1% BSA+PBS-T. Después de 3.5 h de incubación en hielo, se realizó un último paso de lavado antes de añadir 100 µL del sustrato.

6.2. ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS CITRULINADOS ESPECÍFICOS

6.2.1. Anticuerpos frente a un péptido citrulinado de la histona H4

Para evaluar la reactividad frente al péptido cH4/39-40 de la histona H4 se empleó el protocolo descrito [217] con mínimas modificaciones. Se añadieron 100 µL del péptido citrulinado cH4/39-40 o del péptido control H4/39-40 disueltos en buffer 50 mM carbonato pH 9.6 a 25 µg/mL. Las placas se incubaron a 4ºC durante toda la noche, se lavaron 3 veces con 200 µL de PBS-T y se bloquearon con 200 µl de 2% BSA+PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Los sueros se diluyeron 1:100 en 1% BSA+ PBS y se añadieron 100 µL/pocillo seguido de una incubación de 2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados se añadieron 100 µL de un anticuerpo secundario frente a IgG (H+L) conjugado con AP (#109-055-003) diluido 1:5000 en 1% BSA+PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las placas se lavaron 5 veces antes de añadir 100 µL de pNPP.

6.2.2. Anticuerpos frente a péptidos citrulinados de enolasa, vimentina y fibrinógeno

Los datos de estado para los anticuerpos que reconocen los péptidos CEP-1, cVim60-75, cVim2-17, cFibβ36-52 y cFibα27-43 estaban disponibles antes de la realización de esta tesis doctoral. La determinación de anticuerpos frente a los péptidos CEP-1 y cVim60-75 se ha descrito en trabajos previos realizados por el grupo [291,317]. La determinación de anticuerpos frente a los péptidos cVim2-17, cFibβ36-52 y cFibα27-43 se realizó mediante ELISAs siguiendo la metodología previamente publicada [144] y se describe aquí brevemente (A. Montes, no publicado). Los péptidos se utilizaron a 10 µg/mL en 100 µL/pocillo. Los sueros se diluyeron 1:50 en el ensayo con el péptido cFibβ36-52 y 1:100 para el resto de péptidos en buffer de radioinmunoensayo (RIA: 1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) y 100 µL de esta dilución se incubaron 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario utilizado era anti-IgG (H+L) conjugado con AP (#109-055-003) diluido 1:10000

en buffer RIA. El punto de corte se calculó para cada péptido citrulinado por separado como el valor medio del título de anticuerpos (UA) para los controles sanos más 2 veces la desviación estándar (DS).

6.3. ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS ACETILADOS

La detección de autoanticuerpos del isotipo IgG frente a los péptidos de AcLys (anti-AcLys) y de AcOrn (anti-AcOrn) se realizó siguiendo el protocolo de Orgentec (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) [44] y empleando los reactivos provenientes de dos lotes, que incluyen buffer de lavado y de dilución de muestras, anticuerpo secundario frente a IgG humana conjugado con HRP, sustrato 3,3′,5,5′-tetrametilbencidina (TMB) y disolución de parada de la reacción enzimática. No se incluyeron péptidos control sin la modificación en los respectivos aminoácidos dada la baja reactividad encontrada frente a ellos en un estudio previo [44]. Brevemente, las placas que contenían cada uno de los péptidos acetilados y el resto de reactivos se dejaron atemperar antes de su uso. Los sueros se diluyeron 1:100 en el buffer de dilución proporcionado y se añadieron 100 µL a la placa junto con los puntos de la curva de calibrado y los controles del kit. Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente las placas se lavaron 3 veces con 300 µL del buffer de lavado y se añadió el anticuerpo secundario frente a IgG conjugado con HRP (100 µL) seguido de una incubación de 15 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo antes de añadir 100 µL del sustrato TMB, que se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 100 µL de la disolución de parada y tras 5 min se procedió a la lectura de las placas.

El punto de corte del kit viene establecido en 20 UA/mL. Puesto que se tuvo que modificar la calibración, se decidió emplear el suero de controles recogidos en el Hospital Clínico Universitario de Santiago para obtener un nuevo punto de corte tal y como se realizó para el resto de autoanticuerpos. Usando el percentil 98 de la reactividad de los controles se estableció un punto de corte de 64 UA/mL para los anticuerpos anti-AcLys y de 55 UA/mL para los anticuerpos anti-AcOrn.

6.4. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO-ACETALDEHÍDO

Los anticuerpos anti-MAA se determinaron mediante un ELISA indirecto realizando todos los pasos en agitación siguiendo el protocolo previamente descrito [32]. En cada pocillo, se añadieron 100 µL de MAA-HSA modificada (reacción de modificación con ratio 2:1) o HSA no modificada a 20 µg/mL en 0.1 M buffer carbonato pH 9.6 toda la noche a 4ºC. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µL de PBS-T y se bloquearon con 200 µL de 2% BSA+PBS durante 2 h a 4 ºC. Después de otro paso de lavado se añadieron 100 µL de suero diluido 1:100 en 1% BSA+PBS-T, incubándose toda la noche a 4 ºC. Tras otro lavado, se añadieron 100 µL de uno de los anticuerpos secundarios conjugados con AP dirigidos frente a: IgG (H+L, #109-055-003), IgM (específico de las cadenas pesadas µ de la región constante Fc, 5µ Fc, #109-055-043) o IgA (específico de las cadenas α, #109-055-011) diluidos 1:5000, 1:8000 y 1:1000 respectivamente en 1% BSA+PBS-T. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, se realizó un último paso de lavado antes de añadir 100 µL del sustrato.

Los sueros se consideraron positivos para valores de títulos de anticuerpo en UA superiores al percentil 98 de los títulos obtenidos para los controles.

Se probaron otras condiciones para analizar los anticuerpos frente a aductos MAA: utilizar como antígeno MAA-HSA modificada con un ratio 4:1, bloquear con caseína 2% en agua ultrapura obtenida de un sistema de purificación de agua MilliQ Advantage A10 Total Organic Carbon (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 1.5 horas a temperatura ambiente; diluir los sueros en caseína 1% seguidos de una incubación de 1.5 h a temperatura ambiente; y utilizar como anticuerpo secundario un anticuerpo frente a IgG específico de la cadena γ de la región constante, (Fcγ, #109-055-008) conjugado con AP y diluído 1:5000 en caseína 2%.

6.5. ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS DE MALONDIALDEHÍDO

Los anticuerpos anti-MDA se determinaron mediante un ELISA indirecto empleando como antígeno MDA-BSA comercial y siguiendo el protocolo descrito en un trabajo previo [33] con pequeñas variaciones. La BSA modificada o nativa se añadió (50 µL) a una concentración de 3 µg/mL en PBS 1X pH 7.4 y se dejó incubar toda la noche a 4ºC. Tras un lavado con 200 µL de PBS-T se bloquearon las placas con 150 µl de 3% BSA+PBS durante 1 h a temperatura ambiente sin agitación. Después de otro lavado se añadieron los sueros (50 µL) a una dilución 1:100 en 1% BSA+PBS y se incubaron 1.5 h a temperatura ambiente en agitación. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces antes de añadir 50 µL de un anticuerpo formado por el fragmento que contiene las dos regiones de unión a antígeno, $(Fab')_2$ dirigido frente a IgG (H+L) (#309-056-003) o de un anticuerpo completo frente a IgM (5µ Fc, #109-055-043), ambos conjugados con AP, a una dilución de 1:1000 y 1:2000 en 1% BSA+PBS, respectivamente. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente sin agitación se realizaron 4 lavados antes de añadir 100 µL de pNPP, que se incubó durante 60 min antes de la lectura de las placas.

El punto de corte para definir la positividad se estableció en percentil 98 de los títulos en UA obtenidos para los controles.

6.6. ANTICUERPOS FRENTE A ESPECIES CARBONILADAS DE COLÁGENO TIPO II

La determinación de anticuerpos frente a CII carbonilado siguió el protocolo de ELISA indirecto descrito previamente [30,37]. En breve, se incubaron 100 µL/pocillo de HOCl-CII, GLI-CII o CTR-CII a una concentración de 5 µg/mL en PBS pH 7.4 durante toda la noche a 4 ºC. Después de realizar 3 lavados con 200 µL de PBS-T las placas se bloquearon con leche desgrasada al 2% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Tras otro paso de lavado, se añadieron los sueros a una dilución 1:100 en 100 µL de buffer de bloqueo y se incubaron 2 h a 37 ºC. Después de lavar las placas, se añadieron 100 µL de un anticuerpo secundario frente a IgG Fcγ conjugado con AP (#109-055-008) a una dilución 1:2000 en buffer de bloqueo. Al finalizar la incubación de 2 h a 37 ºC, se lavaron de nuevo las placas antes de añadir 100 µL de pNPP.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.7. ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS NITRADAS

La evaluación de anticuerpos anti-Nitra se realizó con un ELISA casero [35]. A cada pocillo se añadieron 50 µL de 3-NT-PS o CTR-PS a una concentración de 2.5 µg/mL en buffer 0.1 M carbonato pH 9.6 y las placas se incubaron durante toda la noche a 4 ºC. El bloqueo se realizó tras lavar 3 veces con PBS-T añadiendo 100 µL de 1% BSA+PBS-T y dejando incubar

durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas y se añadieron 50 µL de suero diluido 1:100 en buffer bloqueo que se dejó incubar otras 2 h a temperatura ambiente. Después de un paso adicional de lavado se añadieron 50 µL de un anticuerpo secundario $F(ab')_2$ frente a IgG (H+L) conjugado con AP (#309-056-003) a una dilución 1:10000 en buffer bloqueo. Tras incubar 1 h a temperatura ambiente se lavaron las placas y se añadió a cada pocillo 100 µL de pNPP.

6.8. ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS NITRADOS

La presencia de anticuerpos anti-Nitra se evaluó también empleando péptidos nitrados como antígeno en un ELISA casero [278]. En primer lugar, se mezclaron los 8 péptidos nitrados por un lado y los 8 péptidos nativos correspondientes por otro lado, todos a la misma concentración en la mezcla. A cada pocillo se añadieron 50 µL de la mezcla de péptidos nitrados o nativos diluidos a 20 µg/mL (2.5 µg/mL de cada péptido en la mezcla) en buffer 0.1 M carbonato pH 9.6 dejando incubar las placas a 4 ºC durante toda la noche. El bloqueo y la adición de los sueros se realizaron como se describe en el protocolo que emplea PS nitradas y control. Posteriormente se añadieron 50 µL de un anticuerpo secundario frente a IgG (H+L) conjugado con la AP (#109-055-003) a una dilución 1:5000 en buffer bloqueo y se dejó incubar a 2 h a temperatura ambiente antes de realizar el último paso de lavado y de añadir 100 µL de pNPP.

6.9. ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS

La presencia de anticuerpos anti-Hci que reconocen la N-ε-homocisteína se determinó mediante un ELISA casero [38]. Primero, se añadieron 100 µL de Hci-PS o CTR-PS diluidas a 10 µg/mL en buffer 0.1 M carbonato pH 9.6 y se incubaron a 4 ºC durante toda la noche. A continuación, se lavaron las placas 3 veces con PBS-T y se bloquearon con 200 µL de gelatina de pez 0.5% en PBS durante 6 h a 4 ºC. Tras otro paso de lavado se añadieron 100 µL de suero diluido 1:200 en 1% BSA+PBS-T a 4 ºC durante toda la noche. Después de otro lavado, se adicionaron 100 µL de un anticuerpo secundario F(ab')2 frente a IgG (H+L) conjugado con AP (#309-056-003) a una dilución 1:20000 en 1% BSA+PBS-T. Las placas se incubaron a 4 ºC durante 3.5 h y se lavaron de nuevo antes de añadir 100 µL de pNPP.

7. GENOTIPADO

Los datos de tipado de las muestras del Hospital Clínico Universitario de Santiago estaban disponibles con anterioridad a la realización de esta tesis doctoral [317]. Los alelos del *HLA-DRB1* se determinaron mediante un método de tipado basado en secuenciación utilizando el kit AlleleSEQR HLA–DRB1 Typing Kit (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA). Este kit discrimina los alelos mediante la secuenciación del exón 2 del locus *DRB1* utilizando el software Assign-SBT 3.2.7 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA) para la interpretación de los resultados. Los alelos que no se resolvieron en este paso se volvieron a secuenciar tras amplificación con cebadores específicos de grupo (GSSP, group-specific sequencing primers). El tipado del SNP rs2476601 en el que se introduce el cambio C1858T en el gen *PTPN22* se realizó con un ensayo TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) excepto donde se indica otro software específico. Los valores de P inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. La representación gráfica de las variables cuantitativas se realizó empleando Statistica 7.0 o GraphPad Prism v5.01 (La Jolla, California, USA).

8.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Las variables cuantitativas se representaron como el valor medio y la desviación estándar (DS) cuando los datos se ajustaron a una distribución normal o como la mediana y el rango intercuartílico (IQR) si los datos no se ajustaron a dicha distribución. Por su parte, las variables cualitativas se representaron a partir de su frecuencia (%). La comparación de las variables cuantitativas se realizó con la prueba t de Student si cumplían criterios de normalidad o con la prueba U de Mann-Whitney en caso de no cumplir con esos criterios. La prueba chi-cuadrado (χ^2) se empleó para comparar las frecuencias de las variables cualitativas en muestras independientes, mientras que para muestras pareadas se empleó la prueba McNemar. La reactividad de los anticuerpos medida como OD en el ELISA se transformó en UA de títulos de anticuerpo interpolando los valores en una curva de regresión logística de 4 parámetros empleando el paquete *drc* [318] del software R 3.4.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). La corrección de la variabilidad detectada entre los lotes del kit para determinar los anticuerpos frente a péptidos acetilados se realizó mediante una normalización por cuantiles de las OD.

Las relaciones entre los diferentes anticuerpos se evaluaron empleando el coeficiente de correlación rho (ρ) de Spearman y el coeficiente de concordancia gamma (γ) de Goodman y Kruskal. El coeficiente ρ muestra el grado de correlación entre los títulos de los anticuerpos mientras que el coeficiente γ indica el grado de concordancia en el estado para cada anticuerpo definido como positivo o negativo. Ambos coeficientes pueden tomar valores desde +1 si la asociación entre las variables es positiva, hasta -1 si la asociación es negativa.

8.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales (ACP) se empleó para reducir el número de anticuerpos al combinar aquellos que poseen información redundante en una nueva variable (componente) no correlacionada con el resto. El número de componentes generados en el ACP es por lo tanto menor que el número de variables iniciales. Al reducir el número de variables que explican la varianza de una muestra se reduce también la dimensionalidad de los datos facilitando su manejo. El estatus para cada uno de los seis anticuerpos frente a antígenos citrulinados específicos (especificidades finas) se introdujo como variable en el análisis. Además, los anticuerpos anti-CCP se analizaron como variable suplementaria. Por otra parte, la matriz de concordancias de los anticuerpos se empleó para representar cada anticuerpo en un gráfico bidimensional empleando el escalado multidimensional (MDS, *Multidimensional Scaling* por sus siglas en inglés) en el que la distancia que separa dos anticuerpos (variables) está inversamente relacionada con su grado de correlación. Adicionalmente, la representación de la relación entre los niveles de los anticuerpos se obtuvo con MDS a partir de la matriz de correlaciones obtenida de los pacientes positivos para los dos anticuerpos analizados.

8.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN

La asociación de la presencia de los anticuerpos con las características clínicas de los pacientes o con los genotipos se analizó mediante regresión logística multivariante con variables de confusión. En estos análisis se consideraron sólo los efectos principales (sin interacciones). Se presentan la *odds ratio* (OR) de los anticuerpos y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Las variables de confusión consideradas no fueron las mismas en todos los apartados del estudio, lo que está indicado al presentar los resultados. Habitualmente, se incluyeron la edad de inicio de los síntomas, el tiempo de evolución de la enfermedad, el sexo y el hospital o cohorte de origen. El tiempo de evolución se considera el tiempo desde la primera visita al reumatólogo hasta la inclusión en el estudio. Además, el estado (positivo o negativo) para los anticuerpos anti-CCP o el FR se incluyó como covariables para evaluar la independencia de las asociaciones de los otros autoanticuerpos. En los análisis de los factores genéticos se consideraron dos niveles para el alelo o alelos de riesgo, portador o no portador, sin diferenciar entre homocigotos y heterocigotos.

La mayoría de los análisis consideraron dos niveles para el estado de cada anticuerpo, negativo o positivo, aunque en otros análisis se consideraron 3 niveles siguiendo el protocolo usado en el desarrollo de los criterios ACR/EULAR del 2010 para la clasificación de la AR [128]. Estos tres niveles se definieron como positivo por encima de 3 veces el punto de corte del ensayo para ese anticuerpo (positivo alto), positivo por debajo de 3 veces el punto de corte (positivo bajo) y negativo. El estado negativo para el anticuerpo o combinaciones de anticuerpos se tomó siempre como referencia en los análisis.

Algunos de los análisis para evaluar el papel de los anticuerpos anti-AcOrn se hicieron mediante regresión logística. Las variables fueron las puntuaciones otorgadas a los anticuerpos según los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 (2 o 3 puntos), o una puntuación igual al número de anticuerpos (presencia de 1, 2 o 3 anticuerpos considerando anti-CCP, FR y anti-AcOrn), o una combinación de los dos modelos. Como referencia en estos tres modelos serológicos se tomó la ausencia simultánea de anticuerpos anti-CCP, FR y anti-AcOrn. Además, el impacto en la clasificación de los tres modelos se evaluó teniendo en cuenta el componente no serológico de los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010. Para ello se emplearon dos estrategias distintas. La primera consistió en sumar las puntuaciones no serológica y serológica. En este análisis, los criterios ACR/EULAR del 2010 se compararon con una puntuación basada en la concordancia: 5 puntos para la presencia de 3 anticuerpos, 3 puntos para 2 anticuerpos, 1 punto para 1 anticuerpo y 0 puntos para la ausencia de anticuerpos; y otra puntuación con una combinación de concordancia con los criterios del 2010: 5 puntos para la presencia de 3 o 2 anticuerpos con títulos altos de anti-CCP o FR, 3 puntos para 3 o 2 anticuerpos con títulos bajos de anti-CCP o FR, 1 punto para la presencia de 1 anticuerpo independientemente de los títulos y 0 puntos para el resto. La segunda estrategia consistió en clasificar los pacientes mediante regresión logística empleando como variables la parte serológica de cada modelo y cada uno de los componentes de la parte no serológica (articulaciones implicadas, reactantes de fase aguda y duración de los síntomas) y fijando la sensibilidad en el 80%.

El nivel de ajuste de los modelos de regresión logística se evaluó empleando dos estadísticos, la R^2 de Nagelkerke y el Criterio de Información de Akaike (AIC). La R^2 de Nagelkerke estima el valor predictivo del modelo como la reducción proporcional del error de

la varianza, de forma que cuanto mayor es su valor mayor es la reducción del error y por lo tanto mejor es el ajuste del modelo a los datos. El AIC realiza una estimación relativa de la información que se pierde en cada modelo por lo que valores más pequeños indican un mejor modelo. Una diferencia >2 en el valor de AIC indica que un modelo se ajusta mejor a los datos en comparación con el otro, pero la diferencia no se considera notable hasta que es >10 [319].

Estos análisis se realizaron empleando el software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) o empleando la aplicación Jamovi de R [320,321].

8.4. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Los parámetros utilizados para evaluar la utilidad de los anticuerpos o combinaciones de anticuerpos en la clasificación de los pacientes con EA fueron la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), la razón de verosimilitud positiva (RV+), la razón de verosimilitud negativa (RV-) y el área bajo la curva (AUC) de la curva operativa del receptor (ROC). La sensibilidad indica la capacidad de la prueba diagnóstica para detectar un sujeto que padece la enfermedad, mientras que la especificidad es la capacidad de la prueba diagnóstica para detectar un sujeto sin la enfermedad. Los valores predictivos indican la probabilidad de padecer o no una enfermedad una vez que se conoce el resultado de la prueba diagnóstica. Estos valores miden la eficacia real de una prueba diagnóstica y dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población. La razón de verosimilitud combina la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica. Se define como la relación de la probabilidad de obtener un resultado positivo o negativo en sujetos enfermos y la probabilidad de obtener ese mismo resultado en sujetos sin la enfermedad. Una prueba diagnóstica útil debe tener un valor de RV- cercano a 0 y un valor de RV+ alto. La curva ROC se construye mediante la representación de la sensibilidad de una prueba diagnóstica en el eje de las ordenadas y el valor 1-especificidad en el eje de abscisas para diferentes puntos de corte de la prueba diagnóstica. La representación de estos valores es una curva que contiene un área determinada denominada AUC. Una AUC de 0.5 indica que la prueba no tiene valor diagnóstico, mientras que una AUC de 1 indica un valor diagnóstico perfecto. Las curvas ROC de las que se obtuvieron los valores de AUC se realizaron el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Los resultados de la clasificación de pacientes a partir de modelos de clasificación que combinan un componente serológico y no serológico se expresaron como sensibilidad (verdaderos positivos/pacientes con AR observados), especificidad (verdaderos negativos/pacientes sin AR observados) y exactitud ([verdaderos positivos + verdaderos negativos]/todos los pacientes). Los valores de sensibilidad y especificidad se compararon con la prueba de McNemar para tablas de contingencia pareadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.5. ANÁLISIS DE LA MORTALIDAD DE LOS CONTROLES SANOS

Se utilizó la valoración del estado de salud de los controles mediante un análisis de la mortalidad como una garantía adicional [322]. Para ello se calculó la tasa de mortalidad estandarizada (SMR, *Standardized Mortality Rate* por sus siglas en inglés) que corresponde a la relación entre las defunciones observadas en los controles y las defunciones esperadas en

una población de referencia según la tasa de mortalidad estratificada por sexo y edad. Una SMR >1 indica que la mortalidad de los controles es superior a la de la población de referencia, y por lo tanto su estado de salud es peor que el estado de salud general y podrían no ser considerados como sujetos sanos. Como población de referencia se seleccionó la de la provincia de A Coruña, donde la mayoría de los controles incluidos en este proyecto tenían su residencia. Los controles se reclutaron desde el 2001 hasta el 2009 y la valoración del estado final se realizó en noviembre de 2015. Como punto final para cada individuo se consideró el año de fallecimiento o la fecha de la última visita o análisis médico recopilada en la base de datos del JANUS (datos censurados). No se analizaron las causas específicas de fallecimiento ya que la finalidad de este análisis era obtener una idea general del estado de salud. El año de referencia para evaluar la SMR fue 2013, calculado como el promedio del último año en el que se disponían datos de los controles. Las tasas de mortalidad de la población de A Coruña se obtuvieron del Instituto Nacional de Estadística (INE), expresadas como defunciones por cada 1000 habitantes en función del sexo y de la edad agrupada en categorías de 5 años.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DE LA PROPUESTA INMUNODOMINANCIA DE UN PÉPTIDO CITRULINADO DE LA HISTONA H4 EN LOS PACIENTES CON AR QUE TIENEN ANTICUERPOS ANTI-CCP

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1. ANTICUERPOS FRENTE A ESPECIFICIDADES FINAS CITRULINADAS EN PACIENTES CON AR Y CONTROLES

Los anticuerpos frente a un péptido citrulinado derivado de la histona H4 (cH4/39-40) se evaluaron en pacientes con AR y controles provenientes del Hospital Clínico Universitario de Santiago de los que se disponía de muestra de suero suficiente. Los pacientes con AR presentaban algunas características diferentes de las de los pacientes de las dos colecciones estudiadas en el trabajo que describió la inmunodominancia del péptido cH4/39-40 (Tabla 8): nuestros pacientes eran más jóvenes que los pacientes de la colección INA y la frecuencia de fumadores era notablemente más baja en comparación con las otras dos colecciones Además, nuestros pacientes pertenecen a un grupo étnico diferente de los pacientes de la colección INA.

Tabla 8. Comparación de las características clínicas de los pacientes con AR utilizados para estudiar los anticuerpos anti-cH4/39-40 en Santiago y en Manitoba. Las variables de edad y tiempo de evolución se representan como la media y la DS mientras que el resto de variables se representan como porcentaje (%). Los datos de las colecciones de Manitoba e INA (*Indigenous North American*) se obtuvieron del trabajo de Meng *y col.* [217]. Dato disponible para < 98% de los pacientes de la colección de Santiago: tiempo de evolución 95.6%, fumadores 92.1%, erosiones 95.2% y FR 96.0%. El primer valor de *P* corresponde a la comparación entre los pacientes con AR de las colecciones de Santiago y de Manitoba. El segundo valor de *P* muestra la comparación de los pacientes de la colección de Santiago y los de la colección INA.

Características clínicas	**Santiago (n = 520)**	**Manitoba (n = 116)**	**INA (n = 130)**	$P_{Santiago\ vs\ Manitoba}$	$P_{Santiago\ vs\ INA}$
Edad, años	61 (14)	59 (13)	46 (13)	0.16	$<1.0x10^{-4}$
Tiempo de evolución de la enfermedad, años	14 (11)	-	-	-	-
Grupo étnico	Europeos	Europeo-Americanos	Indígenos Norteamericanos	-	-
Mujeres	77	80	84	0.42	0.08
Fumadores	20	57	77	$2.0x10^{-15}$	$1.7x10^{-34}$
Erosiones	66	-	-	-	-
Anti-CCP positivo	64	67	69	0.54	0.28
FR positivo	60	-	-	-	-

La reactividad frente al péptido control (H4/39-40, el mismo péptido sin citrulinar) fue mínima tanto en los pacientes con AR como en los controles (Figura 8). En cambio, la reactividad frente el péptido citrulinado cH4/39-40 fue significativamente superior en los pacientes con AR en comparación con los controles (título de anticuerpos anti-cH4/39-40: mediana [IQR] = 3.01 [0.82-17.4] *vs.* 0.60 [0.33-1.07] en pacientes con AR y controles respectivamente; $P = 2.5x10^{-38}$, Figura 8). Los niveles de anticuerpos anti-cH4/39-40 fueron notablemente más elevados en los pacientes anti-CCP positivos en comparación con los pacientes anti-CCP negativos (título de anticuerpos anti-cH4/39-40: mediana [IQR] = 11.67 [3.11-29.30] *vs.* 0.68 [0.36-1.27] en pacientes anti-CCP+ y anti-CCP- respectivamente; *P* =

$2.8x10^{-55}$), y no se observaron diferencias entre los títulos detectados en los pacientes anti-CCP negativos y los controles.

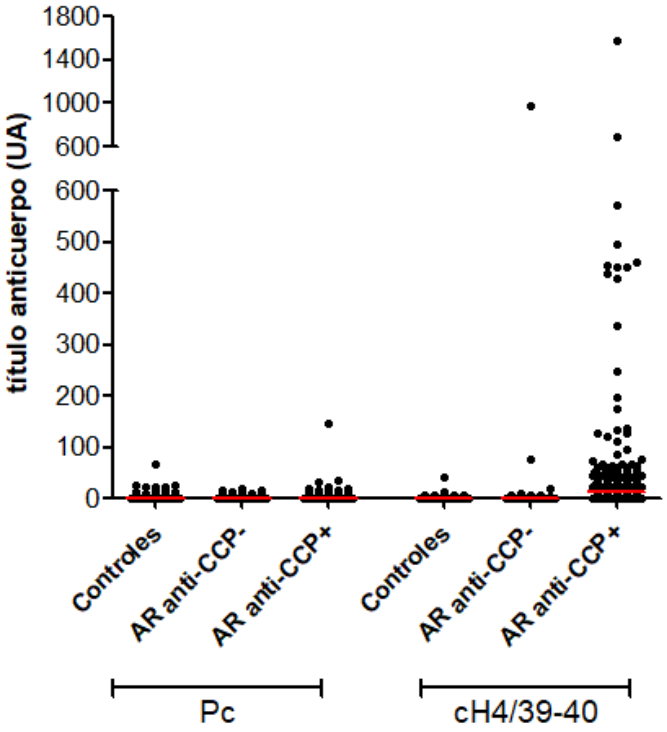


Figura 8. Niveles de anticuerpos frente al péptido control H4/39-40 y citrulinado cH4/39-40 en los pacientes con AR estratificados en función a su estado para los anticuerpos anti-CCP y en los controles de la colección de Santiago. La línea roja representa la mediana de los títulos (UA) en cada grupo.

La sensibilidad detectada para los anticuerpos anti-cH4/39-40 en los pacientes con AR de Santiago fue del 48.1% en el total y del 72.8% en el subgrupo de pacientes con anticuerpos anti-CCP. Estas cifras son inferiores a las descritas previamente. Especialmente importante es el porcentaje en los anti-CCP positivos, inferior al 94.9% y al 92.2% descritos en los pacientes de la colección de Manitoba e INA respectivamente (P $<1.1x10^{-4}$ para la comparación *vs.* Santiago) y que es la base para su propuesta inmunodominancia.

1.2. Relación entre los autoanticuerpos anti-cH4/39-40 y otros anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas

Los pacientes con AR de la colección de Santiago también disponían de información sobre el título y estado de otros anticuerpos frente a diferentes péptidos citrulinados (Tabla 9). Aproximadamente la mitad de los pacientes presentaron anticuerpos anti-cFibB36-52 y anti-cVim60-75, una fracción similar a la detectada para los anticuerpos anti-cH4/39-40. Los anticuerpos que reconocen el péptido citrulinado de la enolasa CEP-1 estuvieron presentes en un tercio de los pacientes, mientras que los anticuerpos anti-cFibA27-43 y anti-cVim2-17 fueron positivos en menos del 20% de los pacientes. La reactividad de los anticuerpos frente a

las especificidades finas citrulinadas se encontró preferentemente en el subgrupo anti-CCP positivo (Tabla 9). Los anticuerpos más prevalentes en este subgrupo fueron los que reconocían el péptido cH4/39-40, pero estuvieron seguidos de cerca por los que reconocían cFibB36-52. Los demás anticuerpos presentaron frecuencias menores en este subgrupo de pacientes siguiendo la misma distribución que en el conjunto total de los pacientes (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de los anticuerpos frente a diferentes especificidades finas en todos los pacientes con AR y en los pacientes anti-CCP positivos de la colección de Santiago. La prevalencia se representa como porcentaje (%). Los anticuerpos se muestran en orden descendente de prevalencia en el subgrupo AR anti-CCP positivo. El primer valor de *P* se ha calculado con la prueba de McNemar en todos los pacientes con AR, mientras que el segundo valor de *P* se ha calculado en los pacientes con AR anti-CCP positivos.

	AR			
Anticuerpos	**Todos**	**anti-CCP+**	*P*	*P*
anti-cH4/39-40	247 (48.1)	238 (72.8)	ref	ref
anti-cFibB36-52	249 (48.0)	216 (64.9)	0.9	$6.4x10^{-3}$
anti-cVim60-75	252 (48.6)	196 (58.9)	0.9	$3.0x10^{-5}$
anti-CEP-1	169 (32.9)	157 (47.7)	$1.6 x10^{-10}$	$2.0 x10^{-12}$
anti-cFibA27-43	79 (15.2)	62 (18.6)	$8.1 x10^{-33}$	$2.4 x10^{-38}$
anti-cVim2-17	41 (7.9)	37 (11.1)	$1.9 x10^{-43}$	$3.9 x10^{-43}$

Los análisis previos no confirmaban de forma clara la inmunodominancia de los anticuerpos anti-cH4/39-40 en comparación con las otras especificidades finas. Para completar el estudio se exploró la relación de los seis anticuerpos frente a péptidos citrulinados entre sí y con los anticuerpos anti-CCP es un análisis de componentes principales (ACP). Este análisis mostró que los dos primeros componentes eran capaces de explicar cerca del 60% de la variabilidad total. El número de componentes necesarios para explicar el 80% de variabilidad fue cuatro. Por lo tanto, la reducción de 6 anticuerpos a 4 componentes principales indica que los anticuerpos no son redundantes.

Otra representación gráfica de la relación entre los distintos ACPA más inexacta pero más sencilla de interpretar se obtuvo mediante MDS de la matriz de concordancias de los anticuerpos (Tabla 10). En este gráfico (Figura 9), los anticuerpos frente a péptidos citrulinados mostraron una dispersión considerable, sin subgrupos claramente definidos. Ni siquiera entre los anticuerpos que reconocen péptidos citrulinados derivados de la misma proteína, como los dirigidos frente a los péptidos cFibB36-52 y cFibA27-43 del fibrinógeno o los péptidos cVim2-17 y cVim60-75 de la vimentina, a pesar de que todos mostraron concordancias significativas. Cabe destacar que los anticuerpos frente a péptidos citrulinados más cercanos a los anti-CCP en la representación fueron los anticuerpos anti-cH4/39-40

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Figura 9), lo que concuerda con la notable concordancia de los anti-cH4/39-40 ($\gamma = 0.96$) con los anti-CCP sobre la del resto de los anticuerpos.

Tabla 10. Matriz de concordancias de los anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas y los anti-CCP. La concordancia se ha evaluado con el coeficiente γ de Goodman y Kruskal.

	cH4/39-40	cFibB36-52	cVim60-75	CEP-1	cFibA27-43	cVim2-17	CCP
cH4/39-40	1.00						
cFibB36-52	0.85	1.00					
cVim60-75	0.60	0.52	1.00				
CEP-1	0.80	0.64	0.49	1.00			
cFibA27-43	0.67	0.91	0.53	0.32	1.00		
cVim2-17	0.70	0.84	0.61	0.35	0.80	1.00	
CCP	0.96	0.79	0.54	0.86	0.39	0.70	1.00

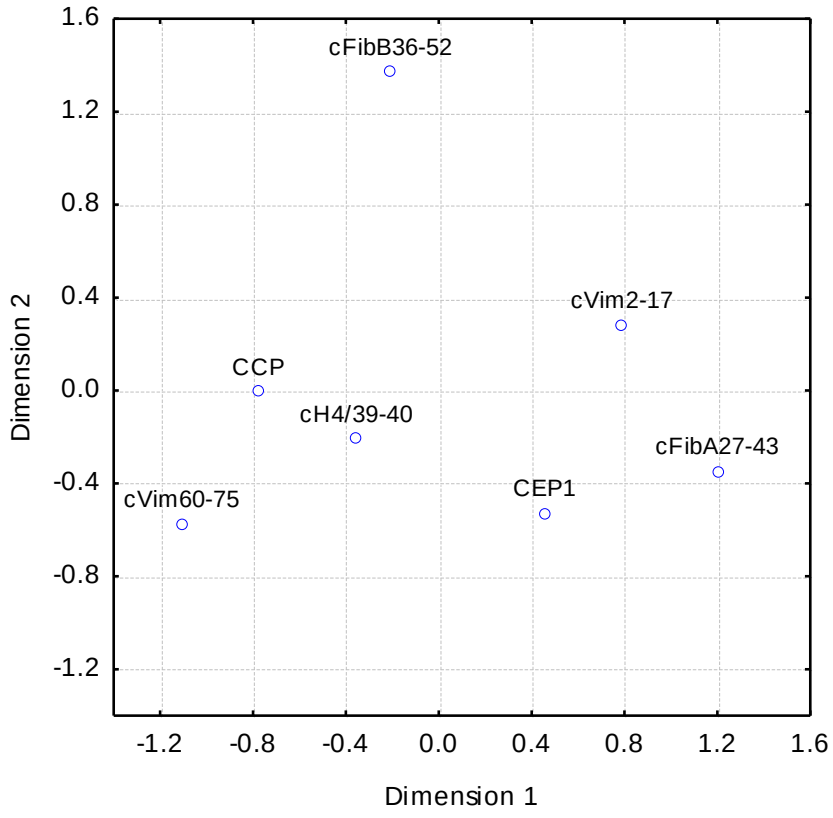


Figura 9. Representación de la concordancia de los anticuerpos frente a seis péptidos citrulinados y los anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR de la colección de Santiago. Para facilitar la interpretación de la figura se muestra el nombre del antígeno que reconocen los anticuerpos.

Un hallazgo similar se obtuvo al emplear la matriz de correlaciones en la representación MDS en lugar de la matriz de concordancias (Tabla 11 y Figura 10). La correlación entre los títulos de los anticuerpos anti-cH4/39-40 y anti-CCP fue similar a la observada entre estos últimos y

los anticuerpos anti-cFibB36-52 (rho = 0.40 y 0.41, respectivamente) aunque ambas fueron superiores a las observadas en el análisis de los otros anticuerpos.

Tabla 11. Matriz de correlaciones de los anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas y los anti-CCP. Las correlaciones se han evaluado con el coeficiente de correlación ρ de Spearman en los pacientes con AR positivos para cada par de anticuerpos. En negrita se resaltan las correlaciones significativas.

	cH4/39-40	cFibB36-52	cVim60-75	CEP-1	cFibA27-43	cVim2-17	CCP
cH4/39-40	1.00						
cFibB36-52	**0.43**	1.00					
cVim60-75	**0.21**	**0.33**	1.00				
CEP-1	**0.24**	**0.24**	0.18	1.00			
cFibA27-43	0.01	0.13	**0.29**	0.00	1.00		
cVim2-17	-0.31	0.17	-0.04	-0.18	**0.45**	1.00	
CCP	**0.40**	**0.41**	0.13	**0.21**	0.03	0.18	1.00

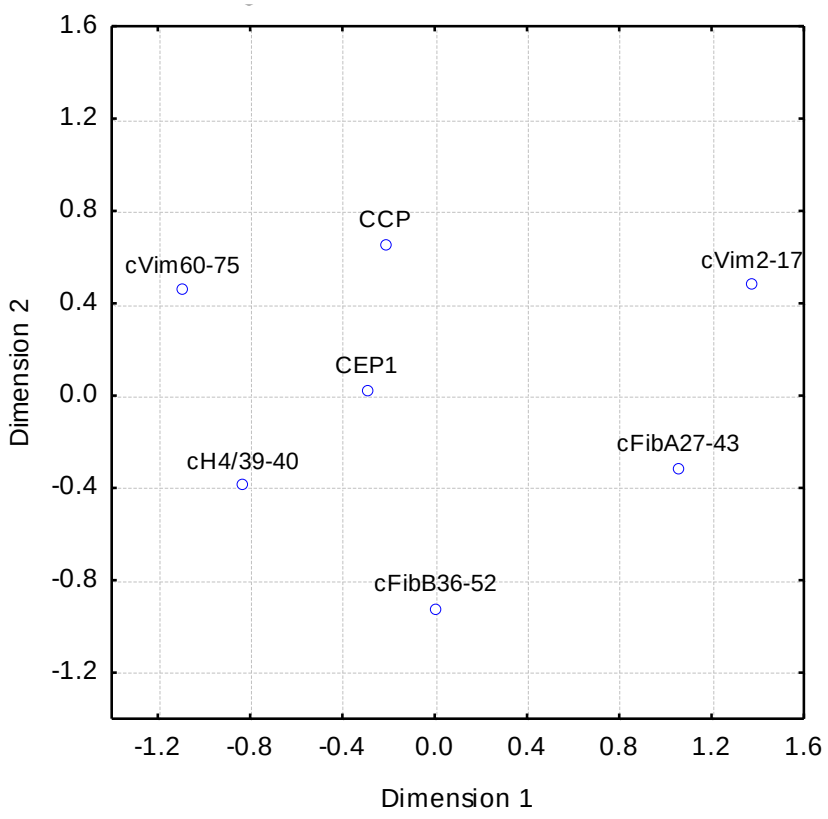


Figura 10. Representación de la correlación entre los títulos de los anticuerpos frente a seis péptidos citrulinados y los anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR de la colección de Santiago. La distancia entre dos puntos en la representación tiene una relación inversa con la correlación de los dos anticuerpos. Para facilitar la interpretación de la figura se muestra el nombre del antígeno que reconocen los anticuerpos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un análisis adicional consistió en comparar la prevalencia de los anticuerpos anti-CCP y frente a especificidades finas citrulinadas en los pacientes con AR de la colección de Santiago con las de otras colecciones de pacientes para evaluar la representatividad de los resultados anteriores (Tabla 12). En este análisis se observó que aunque existe variabilidad entre estudios, las tres especificidades finas más comunes en nuestros pacientes son las más comunes en las demás colecciones, pero ninguna de ellas muestra un papel destacado reproducible.

Tabla 12. Prevalencia de los anticuerpos anti-CCP y los anticuerpos frente a péptidos citrulinados incluidos en el presente estudio en varias colecciones de pacientes con AR. La prevalencia de los anticuerpos se representa como porcentaje (%). Colecciones de pacientes con AR en las que se han evaluado alguno de los anticuerpos frente a especificidades finas citrulinadas de este trabajo: STG, Hospital Clínico Universitario de Santiago (España); CCH, Charing Cross Hospital (Reino Unido) [289]; UUH, Umeå University Hospital (Suecia) [323]; WTCCC, Wellcome Trust Case Control Consortium (Reino Unido) [323]; NARAC, North American Rheumatoid Arthritis Consortium (E.E.U.U) [323]; LEAC, Leiden Early Arthritis Clinic (Países Bajos) [324]; MB, Medical Biobank (Suecia) [143]; EIRA, Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (Suecia) [325].

Anticuerpos	**STG 520**	**CCH 102**	**UUH 538**	**LEAC 661**	**MB 199**	**EIRA 2825**	**WTCCC 1948**	**NARAC 1866**
anti-CCP	64	71	69	53	75	64	78	72
anti-CEP-1	33	37	51	-	67	47	55	55
anti-cFibB36-52	48	-	34	36	65	46	46	48
anti-cVim60-75	49	-	46	26	29	44	64	60
anti-cFibA27-43	15	-	-	14	-	-	-	-
anti-cVim2-17	8	-	12	6	11	31	30	51

1.3. RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS CITRULINADOS CON CARACTERÍSTICAS DE LA AR

Los anticuerpos anti-CCP se detectaron con mayor frecuencia en los pacientes con AR con erosiones en comparación con los que no tenían erosiones, así como en los portadores de algún alelo del EC respecto de los no portadores (Tabla 13 y Tabla 15). Sin embargo, la frecuencia fue similar independientemente del hábito tabáquico (Tabla 14) o de la presencia o ausencia del alelo de riesgo *PTPN22* (Tabla 16). En cuanto a los anticuerpos frente a los péptidos citrulinados específicos, su frecuencia también fue en general significativamente mayor en los pacientes con erosiones y con EC (Tabla 13 y Tabla 15). Solo la frecuencia de los anticuerpos anti-cVim2-17 no estuvo significativamente aumentada en los pacientes con erosiones, y la de los anticuerpos anti-cFibA27-43 en los pacientes portadores del EC. La relación de los anticuerpos con el hábito tabáquico y con alelo de riesgo *PTPN22* fue diferente, siendo los anticuerpos anti-cFib36-52 los únicos que mostraron una prevalencia

significativamente superior en los pacientes fumadores en comparación con los no fumadores (Tabla 14) y los anticuerpos anti-cH4/39-40 en los pacientes portadores en comparación con los no portadores (Tabla 16). Los anticuerpos anti-CCP fueron los más fuertemente asociados con la presencia de erosiones y EC tanto en valor nominal como en significación, seguidos de los anticuerpos anti-cH4/39-40 y anti-CEP-1 en el caso de las erosiones y en el orden inverso en el caso del EC (Tabla 13 y Tabla 15). La asociación con las erosiones en el análisis condicional con los anticuerpos anti-CCP se mantuvo significativa para los anticuerpos anti-cH4/39-40 (OR = 1.87, IC 95% = 1.11 – 3.16; *P* = 0.02) y anti-CEP-1, aunque con un valor nominal y una significación menor. En cambio, la asociación con el EC se mantuvo para los anticuerpos anti-CEP-1, pero no para los anticuerpos anti-cH4/39-40 (OR = 1.06, IC 95% = 0.66 – 1.71; *P* = 0.8). La asociación de los anticuerpos anti-cH4/39-40 con el alelo de riesgo *PTPN22* rozó la significación en el análisis condicional con los anticuerpos anti-CCP (OR = 1.69, IC 95% = 0.99 – 2.88; *P* = 0.056), mientras que la asociación con el tabaco siguió sin ser significativa (OR = 0.87, IC 95% = 0.48 – 1.59; *P* = 0.7).

Tabla 13. Asociación de los anticuerpos anti-CCP y de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados con la presencia de erosiones en pacientes con AR. Las frecuencias de los anticuerpos se representan como porcentaje (%).

Positividad	Sin erosiones (n = 170)	Con erosiones (n = 325)	OR (IC 95%)	*P*
anti-CCP	42.4	75.7	4.24 (2.85-6.30)	$9.0x10^{-13}$
anti-cH4/39-40	28.4	58.6	3.57 (2.39-5.34)	$5.4x10^{-10}$
anti-CEP-1	17.9	39.6	3.01 (1.91-4.75)	$1.9x10^{-6}$
anti-cFibB36-52	34.7	54.3	2.24 (1.52-3.29)	$4.0x10^{-5}$
anti-cVim60-75	39.4	52.8	1.72 (1.18-2.51)	$4.9x10^{-3}$
anti-cFibA27-43	10	17.2	1.87 (1.05-3.34)	0.03
anti-cVim2-17	5.3	8.7	1.70 (0.78-3.69)	0.2

Tabla 14. Asociación de los anticuerpos anti-CCP y de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados con el tabaquismo en pacientes con AR. Las frecuencias de los anticuerpos se representan como porcentaje (%).

Positividad	No fumadores (n = 382)	Fumadores (n = 97)	OR (IC 95%)	*P*
anti-CCP	64.4	60.8	0.86 (0.54 - 1.36)	0.5
anti-cH4/39-40	49.1	44.8	0.84 (0.54 - 1.32)	0.5
anti-CEP-1	32.8	29.2	0.84 (0.52 - 1.38)	0.5
anti-cFibB36-52	45.7	58.8	1.70 (1.08 - 2.67)	0.02
anti-cVim60-75	47.8	47.4	0.99 (0.62 - 1.58)	0.95
anti-cFibA27-43	13.6	20.6	1.65 (0.93 - 2.93)	0.09
anti-cVim2-17	6.6	12.4	2.00 (0.97 - 4.16)	0.06

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 15. Asociación de los anticuerpos anti-CCP y de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados con la presencia de algún alelo del EC en pacientes con AR. Las frecuencias de los anticuerpos se representan como porcentaje (%).

Positividad	EC no portador (n = 221)	EC portador (n = 299)	OR (IC 95%)	*P*
anti-CCP	51.6	73.6	2.61 (1.81-3.78)	$3.2x10^{-7}$
anti-cH4/39-40	39.0	54.9	1.91 (1.33-2.72)	$3.8x10^{-4}$
anti-CEP-1	22.4	40.7	2.38 (1.60-3.53)	$1.6x10^{-5}$
anti-cFibB36-52	41.4	52.8	1.59 (1.12-2.26)	$7.3x10^{-3}$
anti-cVim60-75	39.8	55.0	1.85 (1.30-2.64)	$6.4x10^{-4}$
anti-cFibA27-43	14.0	16.1	1.17 (0.72-1.91)	0.5
anti-cVim2-17	5.0	10.1	2.13 (1.04-4.35)	0.04

Tabla 16. Asociación de los anticuerpos anti-CCP y de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados con la presencia del alelo *PTPN22* en pacientes con AR. Las frecuencias de los anticuerpos se representan como porcentaje (%).

Positividad	*PTPN22* no portador (n = 380)	*PTPN22* portador (n = 137)	OR (IC 95%)	*P*
anti-CCP	62.6	68.6	1.30 (0.86-1.98)	0.2
anti-cH4/39-40	44.9	56.6	1.60 (1.08-2.38)	0.02
anti-CEP-1	32.4	33.6	1.06 (0.69-1.61)	0.8
anti-cFibB36-52	45.4	54.0	1.41 (0.95-2.09)	0.08
anti-cVim60-75	47.5	51.8	1.19 (0.80-1.76)	0.4
anti-cFibA27-43	16.3	11.7	0.68 (0.38-1.22)	0.2
anti-cVim2-17	7.4	8.8	1.21 (0.60-2.46)	0.6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2

POTENCIAL PARA UNA MEJOR CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EA CON LOS ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS ACETILADOS

Los resultados de este capítulo se han publicado como: Lorena Rodriguez-Martínez [1], Holger Bang [2], Cristina Regueiro [1], Laura Nuño [3], Ana Triguero-Martinez [4], Diana Peiteado [3], Ana M. Ortiz [4], Alejandro Villalba [3], Ana Martinez-Feito [3], Alejandro Balsa [3], Isidoro Gonzalez-Alvaro [4], Antonio Gonzalez [1]. Improved classification of rheumatoid arthritis with a score including anti-acetylated ornithine antibodies. Sci Rep 2020;10:19263. Anexo 1. doi:10.1038/s41598-020-73919-y. ISSN: 20452322

[1] Experimental and Observational Rheumatology and Rheumatology Unit. Instituto de Investigacion Sanitaria - Hospital Clínico Universitario de Santiago (IDIS), Travesia Choupana, sn. 15706-Santiago de Compostela, Spain.
[2] Orgentec Diagnostika GmbH, Carl-Zeiss-Straße 49-51, 55129-Mainz, Germany.
[3] Rheumatology Department. Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IDIPAZ), Paseo de la Castellana, 261. 28046- Madrid, Spain.
[4] Rheumatology Department. Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IIS-lP), Calle de Diego de León, 62. 28006-Madrid, Spain.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.1. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS ACETILADOS EN LOS PACIENTES CON EA

Para realizar este estudio se emplearon los sueros de la visita basal de 1062 pacientes con EA que habían completado dos años de seguimiento procedentes del Hospital La Paz (n=525) y del estudio PEARL (n=537). En general, los pacientes de ambas cohortes presentaron características similares, aunque los pacientes del Hospital de La Paz eran más jóvenes y mostraron una menor prevalencia de mujeres y menor tiempo de evolución de la artritis en comparación con los pacientes de la cohorte PEARL (Tabla 17).

Tabla 17. Comparación de las características de los pacientes con EA procedentes de las cohortes del Hospital La Paz y de PEARL. Las variables de edad de inicio de los síntomas y tiempo de evolución se representan como la mediana y el IQR mientras que el resto de variables se representan como porcentaje (%). El valor de *P* se muestra para la comparación entre las dos cohortes.

Características	EA total (n=1062)	EA La Paz (n=525)	EA PEARL (n=537)	*P*
Edad de inicio de los síntomas, años	52.0 (40.0-65.2)	50.0 (39.0-65.0)	53.6 (41.7-65.9)	0.02
Tiempo de evolución, semanas	16.0 (8.0-28.1)	12.0 (6.0-22.0)	21.5 (11.9-33.7)	$<1.0x10^{-16}$
Mujeres	818 (77.0)	389 (74.1)	429 (79.9)	0.03
Fumadores	444 (45.1)	222 (46.5)	222 (43.8)	0.4
FR positivo	444 (41.8)	217 (41.3)	227 (42.3)	0.8
Anti-CCP positivo	395 (37.8)	201 (38.3)	194 (36.1)	0.7
Anti-CarP positivo	291 (27.4)	146 (27.8)	145 (27.0)	0.8
Anti-AcLys positivo	142 (13.4)	73 (14.0)	69 (12.8)	0.6
Anti-AcOrn positivo	236 (22.2)	125 (23.9)	111 (20.7)	0.2
AR	530 (49.9)	252 (48.0)	278 (51.8)	0.2
AI	212 (20.0)	90 (17.1)	122 (22.7)	0.02
Otros diagnósticos	320 (30.1)	183 (34.9)	137 (25.5)	$9.1x10^{-4}$

Los pacientes se clasificaron como AR o no AR al final del seguimiento según los criterios ACR 1987 [162]. La elección de estos criterios como estándar en las comparaciones posteriores se realizó en base a la mayor sensibilidad de los criterios en este momento del seguimiento en comparación con la primera visita. Los 1062 pacientes con EA se dividieron al final de los dos años de seguimiento en 49.9% como AR y 50.1% como no AR. Este último grupo incluía un 20.0% de pacientes con artritis indiferenciada (AI) y un 30.1% de pacientes agrupados en la categoría otros EA (OEA) que presentaban otras enfermedades menos comunes incluyendo

síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica y enfermedad inflamatoria intestinal. El análisis retrospectivo mostró que los pacientes clasificados como AR y los no AR ya diferían en varias características en la primera visita: edad, duración de los síntomas, actividad de la enfermedad, presencia de erosiones y la prevalencia de los autoanticuerpos tal y como se muestra en la Tabla 18. Efectivamente, los cinco anticuerpos, incluyendo los dos AAPA, estaban significativamente asociados con la AR (Tabla 18). Sin embargo, esta asociación de los AAPA con la AR no se reflejó en los títulos (Figura 11), mostrando los pacientes del subgrupo no AR positivos para cada anticuerpo títulos similares a los pacientes con AR (títulos anticuerpos anti-AcLys: mediana [IQR] = 159.6 [83.8-2062.5] *vs.* 272.3 [114.0-2320.0]; *P* = 0.1; títulos anticuerpos anti-AcOrn: mediana [IQR] = 351.7 [140.8-2575.0] *vs.* 346.4 [115.9-2410.0]; *P* = 0.7, no AR *vs.* AR en todas las comparaciones).

Tabla 18. Comparación de las características clínicas y serológicas de los pacientes con EA clasificados como AR y no AR. Los pacientes con EA se clasificaron como AR o no AR 2 años después de la primera visita siguiendo los criterios de clasificación ACR de 1987. Las variables de edad de inicio de los síntomas, tiempo de evolución y DAS28 se representan como la mediana y el IQR mientras que el resto de variables se representan como porcentajes (%). Información disponible para <98% de los pacientes: fumadores = 92.7%; erosiones = 83.1%; DAS28 = 95.6%. El valor de *P* se muestra para la comparación entre los pacientes clasificados como AR y no AR.

	EA total (n=1062)	**AR (n=530)**	**No AR (n=532)**	***P***
Edad inicio de los síntomas, años	52.0 (40.0-65.2)	54.0 (43.0-67.4)	49.2 (37.0-63.6)	$2.5x10^{-5}$
Tiempo de evolución, semanas	16.0 (8.0-28.1)	19.9 (11.0-30.7)	12.0 (6.0-26.4)	$1.6x10^{-10}$
Mujeres	818 (77.0)	420 (79.2)	398 (74.8)	0.09
Fumadores	444 (45.1)	234 (46.0)	210 (44.2)	0.6
Erosiones	93 (10.5)	77 (14.6)	16 (4.5)	$1.9x10^{-6}$
DAS28	4.5 (3.4-5.8)	5.2 (3.9-6.3)	3.9 (2.9-4.9)	$1.3x10^{-34}$
FR positivo	444 (41.8)	358 (67.5)	86 (16.2)	$1.3x10^{-64}$
Anti-CCP positivo	397 (37.4)	351 (66.2)	46 (8.6)	$9.1x10^{-84}$
Anti-CarP positivo	291 (27.4)	222 (41.9)	69 (13.0)	$4.4x10^{-26}$
Anti-AcLys positivo	142 (13.4)	111 (21.1)	31 (5.8)	$2.9x10^{-13}$
Anti-AcOrn positivo	236 (22.2)	191 (36.1)	45 (8.5)	$2.6x10^{-27}$
AAPA positivo	259 (24.5)	209 (39.7)	50 (9.4)	$2.2x10^{-30}$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

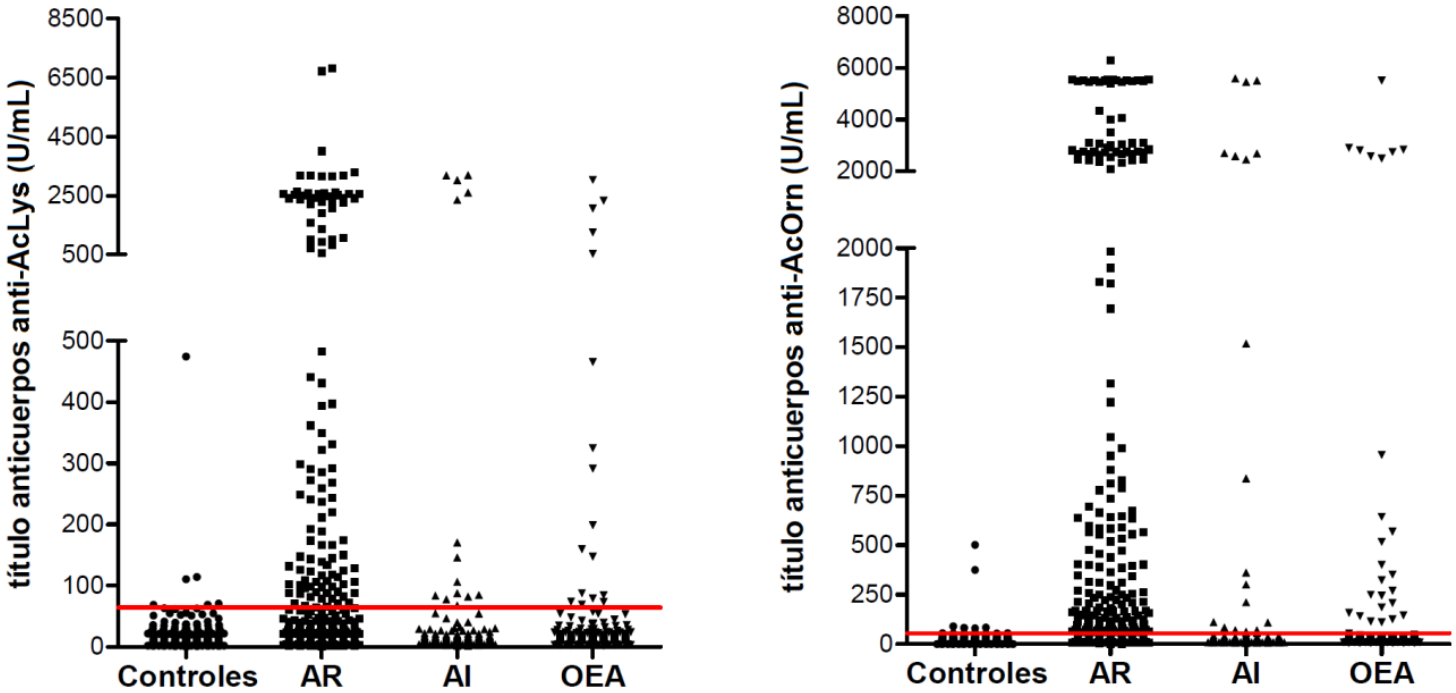


Figura 11. Títulos de los anticuerpos anti-AcLys y anti-AcOrn en los pacientes clasificados con AR, AI y OEA al final del seguimiento y en los controles sanos. Los pacientes con EA se han estratificado según la clasificación al final del seguimiento: AR, AI y OEA. Cada punto representa el título de un individuo, y la línea roja horizontal el punto de corte establecido para determinar la positividad (64 U/mL para los anticuerpos anti-AcLys y 55 U/mL para los anticuerpos anti-AcOrn) a partir de los títulos de los controles sanos del Hospital Clínico Universitario de Santiago (n = 270).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los AAPA mostraron una discriminación modesta relativa a la de los anticuerpos clásicos anti-CCP y FR atribuida a su menor prevalencia en los pacientes con AR. En los pacientes del subgrupo no AR los AAPA mostraron una presencia nada despreciable que no fue específica para los pacientes clasificados como AI u OEA (Tabla 19) cuando se empleó el punto de corte definido en los 270 controles sanos de Santiago.

Tabla 19. Características de los pacientes con EA clasificados como AI u OEA después de dos años de seguimiento. Las variables de edad de inicio de los síntomas, tiempo de evolución y DAS28 se representan como la mediana y el IQR mientras que el resto de variables se representan como porcentajes (%). Información disponible para <95% de los pacientes: fumadores = 89.3; erosiones = 66.5%; DAS28 = 94.7%; tiempo de evolución = 94.9%. El valor de *P* se muestra para la comparación entre los pacientes con AI y OEA.

	AI (n=212)	**OEA (n=320)**	***P***
Edad inicio de los síntomas, años	49.1 (37.0-63.9)	49.3 (37.0-63.6)	0.6
Tiempo de evolución, semanas	16.0 (7.9-30.2)	12.0 (5.0-24.0)	$6.3x10^{-3}$
Mujeres	170 (80.2)	228 (71.3)	0.02
Fumadores	83 (43.5)	127 (44.7)	0.8
Erosiones	6 (3.1)	10 (6.3)	0.1
DAS28	3.9 (3.0-4.8)	3.9 (2.8-5.0)	0.6
FR positivo	42 (19.8)	44 (13.8)	0.06
Anti-CCP positivo	26 (12.3)	20 (6.3)	0.02
Anti-CarP positivo	25 (11.8)	44 (13.8)	0.5
Anti-AcLys positivo	14 (6.6)	17 (5.3)	0.5
Anti-AcOrn positivo	20 (9.4)	25 (7.8)	0.5
AAPA positivo	23 (10.8)	27 (8.4)	0.4

Para completar los análisis anteriores, la asociación entre la presencia de AAPA y AR se evaluó mediante regresión logística empleando otras anticuerpos y variables como factores de confusión (Tabla 20). Los dos AAPA se asociaron fuertemente con la AR cuando se consideró el género, la edad y la cohorte como variables de confusión. Sin embargo, los anticuerpos anti-AcLys no se asociaron con la AR cuando se incluyó en el análisis la presencia de los anticuerpos anti-CCP y el FR (Tabla 20). Este resultado indica que la asociación mostrada por los anticuerpos anti-AcLys se explica por su concordancia con los

otros autoanticuerpos. Por el contrario, los anticuerpos anti-AcOrn permanecieron asociados con la AR cuando se incluyeron los anticuerpos anti-CCP y FR en el modelo de regresión logística, incluso cuando se añadieron los anticuerpos anti-CarP (Tabla 20), lo que indica que los anticuerpos anti-AcOrn contienen información estadísticamente independiente de los otros autoanticuerpos. En el análisis más completo incluyendo cuatro autoanticuerpos, la fuerza de la asociación con la AR fue en orden decreciente desde los anticuerpos anti-CCP (OR=10.0) hasta el FR (OR=2.9), los anticuerpos anti-AcOrn (OR=1.6) y los anticuerpos anti-CarP (OR=1.6). La combinación de los dos AAPA sólo mostró una asociación marginalmente más fuerte que la de los anticuerpos anti-AcOrn por separado (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de regresión logística de la asociación de los anticuerpos anti-péptidos acetilados con la AR. Todos los modelos de regresión incluyeron como variables de ajuste adicionales la edad, el género y la cohorte de los pacientes con EA.

Ajustado por	**Anticuerpos anti-péptidos acetilados**	**OR**	**IC 95%**	***P***
Ningún anticuerpo				
	anti-AcLys	4.4	2.9-6.7	7.0×10^{-12}
	anti-AcOrn	6.5	4.5-9.3	2.3×10^{-24}
	AAPA	6.8	4.8-9.6	3.8×10^{-27}
anti-CCP/FR				
	anti-AcLys	1.4	0.8-2.5	0.2
	anti-AcOrn	1.7	1.1-2.8	2.1×10^{-02}
	AAPA	1.8	1.1-2.8	1.2×10^{-02}
anti-CCP/FR/anti-CarP				
	anti-AcLys	1.4	0.8-2.4	0.3
	anti-AcOrn	1.6	1.0-2.6	4.5×10^{-02}
	AAPA	1.7	1.1-2.7	2.5×10^{-02}

También se exploró si la estratificación de los AAPA por sus títulos podría aumentar su valor discriminatorio. Para ello se definieron tres niveles para los títulos como se describe en los criterios de clasificación ACR/EULAR del 2010: negativo y por encima o por debajo de 3 veces el punto de corte de los pacientes positivos (Tabla 21). A diferencia de lo observado para los anticuerpos anti-CCP y el FR, los títulos altos de los AAPA no estaban más asociados con la AR que los títulos bajos. Estos resultados excluyen la estratificación por el título de los AAPA de las reglas de clasificación.

Tabla 21. Asociación de los anticuerpos anti-péptidos acetilados estratificados por el título con la clasificación como AR. Los títulos de los anticuerpos se dividieron en alto y bajo relativo a tres veces el punto de corte para definir pacientes positivos. Los análisis de regresión logística incluyeron la edad, el género y la cohorte como variables adicionales.

		OR	**IC 95%**	***P***
anti-CCP o FR				
	bajo *vs.* negativo	2.2	1.4-3.4	$4.6x10^{-4}$
	alto *vs.* negativo	30.4	20.5-45.2	$1.5\ x10^{-64}$
	alto *vs.* bajo	12.5	7.3-21.3	$1.4\ x10^{-20}$
anti-AcLys				
	bajo *vs.* negativo	3.4	1.9-6.0	$3.8x10^{-5}$
	alto *vs.* negativo	5.7	3.1-10.4	$1.2x10^{-8}$
	alto *vs.* bajo	2.0	0.9-4.9	0.1
anti-AcOrn				
	bajo *vs.* negativo	7.1	3.9-13.0	$1.9x10^{-10}$
	alto *vs.* negativo	6.3	4.1-9.6	$2.0\ x10^{-17}$
	alto *vs.* bajo	0.9	0.4-1.8	0.7

2.2. RELACIÓN ENTRE LOS AUTOANTICUERPOS

Los dos AAPA mostraron una concordancia notablemente alta en el estado, tanto en los pacientes con AR ($\gamma = 0.89$, $P = 8.9\ x10^{-70}$) como en los no AR ($\gamma = 0.98$, $P = 1.5\ x10^{-119}$). Como consecuencia, sus relaciones con los anticuerpos anti-CCP y FR fueron similares (Figura 12). Para los anticuerpos anti-AcOrn, los dos subgrupos más grandes en los pacientes con AR estaban formados por los triple positivos y por los doble positivos para anti-CCP y FR (Figura 12A). El subgrupo de pacientes positivos únicamente para los anticuerpos anti-AcOrn, que es particularmente importante para aumentar la sensibilidad de la clasificación de pacientes con AR, representó sólo el 2.3% del total (o el 9.3% de los pacientes con AR seronegativos para FR y anticuerpos anti-CCP). En cambio, en los pacientes no AR se observó una distribución completamente diferente (Figura 12B) en los que el subgrupo más grande se correspondía con el de pacientes negativos para los tres anticuerpos, seguidos por los pacientes positivos para un único anticuerpo: FR, anti-AcOrn o anti-CCP.

El análisis de la relación de los anticuerpos empleando los anticuerpos anti-AcLys mostró una distribución idéntica a la observada con los anticuerpos anti-AcOrn en los pacientes del subgrupo no AR (Figura 12D). Por el contrario, la distribución de los anticuerpos anti-AcLys en los pacientes con AR no se asemejó a la de los anticuerpos anti-AcOrn: estaba dominada por el subgrupo de pacientes doble positivos para los anticuerpos anti-CCP y FR seguido de los pacientes triple negativos y un reducido subgrupo de pacientes triple positivos (Figura 12C). Cabe destacar que los dos subgrupos críticos para mejorar la clasificación como AR

fueron menos frecuentes al evaluar los anticuerpos anti-AcLys en comparación con los anti-AcOrn (Figura 12A y Figura 12C): los pacientes positivos sólo para el AAPA y los pacientes triple positivos que contribuyen a la clasificación basada en la concordancia de anticuerpos.

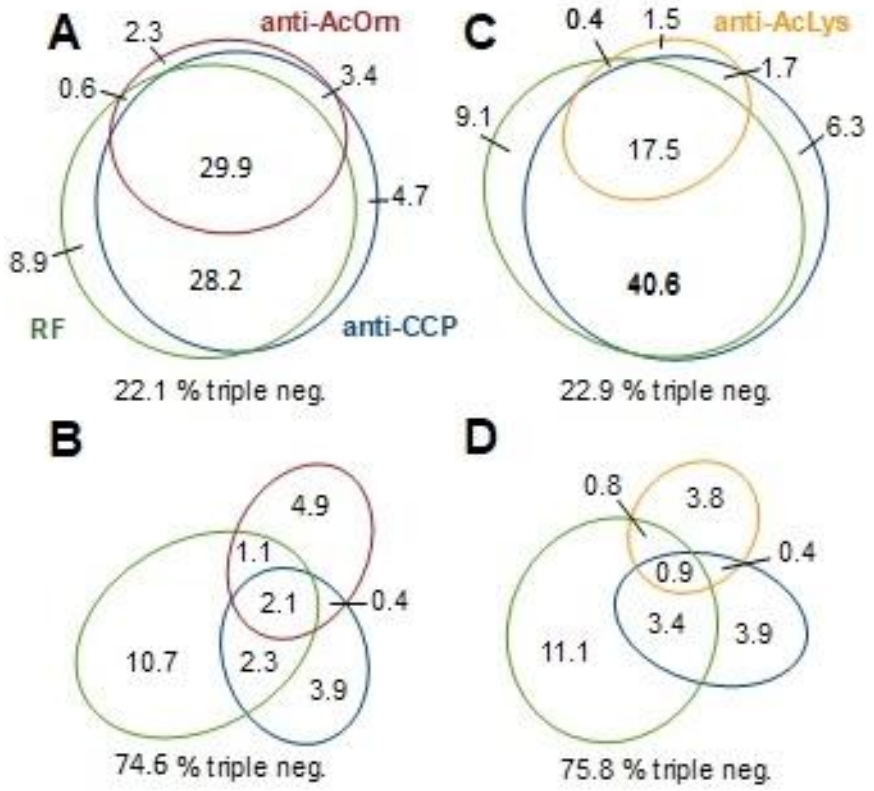


Figura 12. Relaciones de los AAPA con FR y anticuerpos anti-CCP en los pacientes con EA. Las relaciones de los anticuerpos anti-AcOrn se muestran en las figuras A y B, mientras que las relaciones de los anticuerpos anti-AcLys se muestran en las figuras C y D. Las figuras A y C representan los pacientes con AR, mientras que las figuras B y D muestran los pacientes no AR. Los porcentajes mostrados en los gráficos se refieren al total de pacientes.

2.3. PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DE LOS AAPA

La capacidad de los AAPA para identificar los pacientes con EA que finalmente desarrollarán AR se evaluó empleando parámetros utilizados comúnmente para valorar marcadores diagnósticos. Los dos parámetros más importantes, sensibilidad y especificidad, se compararon con el estándar actual de los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 que combina la positividad para los anticuerpos anti-CCP y/o FR ("anti-CCP o FR") [164] (Tabla 22). Este análisis mostró que los AAPA fueron notablemente menos sensibles en comparación con el estándar actual cuando se consideraron todos los pacientes con AR. Además, los AAPA estuvieron presentes en menos del 11% de los pacientes anti-CCP negativos o anti-CCP/FR doble negativos. Por el contrario, los AAPA mostraron una elevada especificidad (Tabla 22). Su valor fue superior al de la especificidad de la combinación "anti-CCP o FR" y se mantuvo en los dos subgrupos de pacientes seronegativos. Esta elevada especificidad

sugirió la posibilidad de obtener una mejor clasificación al incluir un nuevo anticuerpo con el operador *o* en la combinación "anti-CCP o FR".

Las combinaciones de tres y cuatro anticuerpos mostraron un aumento modesto, aunque significativo en la sensibilidad (Tabla 22). El aumento fue de 1.4% para los anticuerpos anti-AcLys, 2.2% para los anticuerpos anti-AcOrn y 2.5% para los AAPA ($P < 0.015$ para todas las comparaciones empleando como referencia el criterio "anti-CCP o FR"). Estas mejoras se asociaron con un descenso en la especificidad de 3.7% para los anticuerpos anti-AcLys, 4.9% para los anticuerpos anti-AcOrn y 5.4% para los AAPA ($P < 2.5x10^{-5}$ para todas las comparaciones empleando como referencia el criterio "anti-CCP o FR"). En otras palabras, la relación coste-beneficio de las combinaciones de anticuerpos fue de 1:2.2 para la combinación "anti-CCP o FR o anti-AcOrn" y "anti-CCP o FR o anti-AcOrn o anti-AcLys". Este ratio indica que por cada nuevo paciente correctamente clasificado como AR se clasificarán incorrectamente 2.2 pacientes sin AR como si tuvieran AR. Por su parte, el ratio coste-beneficio con la combinación "anti-CCP o FR o anti-AcLys" fue de 1:2.6 y el ratio recientemente descrito para la combinación "anti-CCP o FR o anti-CarP" fue de 1:3.7 [176]. Estos valores no fueron significativamente diferentes entre ellos.

Tabla 22. Sensibilidad y especificidad de los AAPA para la clasificación como AR de los pacientes con EA. Los anticuerpos se consideraron por separado y en combinaciones con el operador *o*. Los parámetros de sensibilidad, especificidad se evaluaron en todos los pacientes con EA (todos), en el subgrupo de pacientes anti-CCP negativo (anti-CCP-) y en subgrupo de pacientes anti-CCP y FR doble negativos (anti-CCP-/FR-). na = no aplicable.

	anti-AcLys	anti-AcOrn	AAPA	anti-CCP o FR	Anti-CCP o FR o anti-AcLys	Anti-CCP o FR o anti-AcOrn	anti-CCP o FR o AAPA
Sensibilidad							
todos	21.1	36.1	39.7	75.7	77.1	77.9	78.2
anti-CCP-	5.6	8.4	9.6	27.9	32.6	34.6	35.4
anti-CCP-/FR-	6.3	9.3	10.2	na	6.3	9.3	10.2
Especificidad							
todos	94.2	91.5	90.6	79.5	75.8	74.6	74.1
anti-CCP-	95.1	93.4	92.6	87	82.9	81.7	81.1
anti-CCP-/FR-	95.3	93.9	93.1	na	95.3	93.9	93.1

Como alternativa, se evaluó el valor de la combinación de los AAPA con el FR y los anticuerpos anti-CCP empleando el operador *y*, pero este enfoque resultó en una disminución considerable en la sensibilidad, el parámetro que necesita ser mejorado para detectar pacientes con AR (Tabla 23). Ninguno de los otros parámetros analizados (VPP, VPN, RV+, RV- y AUC) mostró una mejoría significativa al incluir los AAPA respecto del estándar "anti-CCP o FR" (Tabla 24).

Tabla 23. Sensibilidad y especificidad de los AAPA en las combinaciones con el FR y los anticuerpos anti-CCP usando el operador *y* para la clasificación como AR de los pacientes con EA. La sensibilidad y la especificidad se evaluaron en todos los pacientes con EA (todos) y en el subgrupo de pacientes anti-CCP negativos (anti-CCP-).

	anti-CCP o FR	(FR o anti-CCP) y anti-AcLys	(FR o anti-CCP) y anti-AcOrn	(FR o anti-CCP) y AAPA
Sensibilidad				
todos	75.7	19.6	33.8	37.2
anti-CCP-	27.9	1.1	1.7	2.2
Especificidad				
todos	79.5	97.9	96.4	96.1
anti-CCP-	87.0	99.2	98.8	98.6

Tabla 24. Parámetros para evaluar el valor diagnóstico de los AAPA y sus combinaciones. Los anticuerpos se consideraron por separado y en las combinaciones con el operador *o*. Los parámetros de valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RV+) y negativa (RV-) y área bajo la curva (AUC) se evaluaron en todos los pacientes con EA (todos), en el subgrupo de pacientes anti-CCP negativos (anti-CCP-) y en el subgrupo de pacientes anti-CCP y FR doble negativos (anti-CCP-/FR-). na = no aplicable.

	anti-AcLys	anti-AcOrn	anti-CCP o FR	Anti-CCP o FR o anti-AcLys	Anti-CCP o FR o anti-AcOrn
VPP					
todos	78.2	80.9	78.6	75.8	75.3
anti-CCP-	29.4	31.9	44.2	41.1	41.1
anti-CCP-/FR-	28.6	31.6	na	28.6	31.6
VPN					
todos	54.8	59.0	76.6	77.1	77.2
anti-CCP-	73.3	73.5	76.6	77.1	77.2
anti-CCP-/FR-	77.1	77.2	na	77.1	77.2
RV+					
todos	3.6	4.3	3.7	3.2	3.1
anti-CCP-	1.1	1.3	2.2	1.9	1.9
anti-CCP-/FR-	1.3	1.5	na	1.3	1.5
RV-					
todos	0.8	0.7	0.3	0.3	0.3
anti-CCP-	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8
anti-CCP-/FR-	1.0	1.0	na	1.0	1.0
AUC					
todos	0.58	0.64	0.78	0.77	0.76
anti-CCP-	0.50	0.51	0.58	0.58	0.58
anti-CCP-/FR-	0.51	0.52	na	0.51	0.52

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4. MEJORA DE LA CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA BASADA EN LA CONCORDANCIA DE ANTICUERPOS

Las relaciones de los anticuerpos anti-CCP, FR y anti-AcOrn presentadas anteriormente (Figura 12A y Figura 12B) sugirieron que su concordancia podría ser útil para la clasificación de la AR. Esta hipótesis estaba apoyada además por la discriminación que ofrece el número de anticuerpos positivos en relación con el componente serológico de los criterios de clasificación ACR/EULAR del 2010 (Tabla 25). Por lo tanto, se comparó directamente el componente serológico de los criterios del 2010 con la concordancia de anticuerpos en relación con su asociación con la AR en dos modelos de regresión logística separados y en un modelo que combinaba los dos componentes (Tabla 26). En las regresiones logísticas realizadas por separado, el valor más alto de OR (48.7) fue para la presencia concordante de tres anticuerpos (FR, anti-CCP y anti-AcOrn). El siguiente valor más elevado fue para la presencia concordante de dos anticuerpos (OR = 28.5) y a un nivel similar para los títulos altos de anticuerpos anti-CCP o FR (OR = 25.9). Este mismo orden se observó en el modelo de regresión que combinaba los dos componentes serológicos (OR = 11.4, 7.9 y 4.4 respectivamente, Tabla 26). Esta jerarquía indica que la concordancia de anticuerpos tiene un peso mayor que el nivel más alto de la serología de los criterios del 2010, por lo que la concordancia podría mejorar la clasificación que se obtiene con el componente serológico del 2010.

Tabla 25. Tabla de contingencia de los pacientes con EA según la puntuación serológica de los criterios de clasificación del 2010 y el número de anticuerpos positivos concordantes (FR, anti-CCP y anti-AcOrn). Cada celda de la tabla contiene el número de pacientes con EA y, entre paréntesis, el porcentaje del total de la fila que representan.

		Concordancia de anticuerpos			
	puntuación	0Ab	1Ab	2Ab	3Ab
Criterio serológico 2010	3	0 (0)	57 (14.5)	169 (43.1)	166 (42.3)
	2	0 (0)	90 (80.4)	19 (17.0)	3 (2.7)
	0	514 (93.1)	38 (6.9)	0 (0)	0 (0)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 26. Comparación de los modelos de regresión logística para la clasificación de la AR basados en el componente serológico de los criterios del 2010, la concordancia de anticuerpos y la combinación de los dos. Se muestra la OR y el intervalo de confianza del 95%. Los estratos en cursiva no contribuyeron de forma significativa a la clasificación de la AR. 2010 ACR/EULAR: componente serológico de los criterios ACR/EULAR de clasificación de la AR del 2010; Ccdc. anti-AcOrn: concordancia de anticuerpos anti-CCP, FR y anti-AcOrn; 2010 + Ccdc. Anti-AcOrn: combinación de los dos componentes serológicos anteriores.

	2010 ACR/EULAR	**Ccdc. anti-AcOrn**	**2010 + Ccdc. anti-AcOrn**
Categoría	**OR (IC 95%)**	**OR (IC 95%)**	**OR (IC 95%)**
3	25.9 (17.9-37.6)	-	4.4 (1.9-10.4)
2	2.5 (1.6-3.8)	-	*1.2 (0.5-2.6)*
3Ab	-	48.7 (25.5-93.0)	11.4 (4.0-32.9)
2Ab	-	28.5 (17.1-47.4)	7.9 (3.0-20.4)
1Ab	-	2.7 (1.9-3.9)	*1.6 (0.8-3.2)*

Para demostrar que realmente se obtiene una mejoría se comparó la calidad del ajuste de los modelos de regresión con los parámetros R^2 y AIC. El valor de R^2 es mejor cuando es más alto, como en el modelo de la concordancia (0.451) comparado con el componente serológico del 2010 (0.422). Por el contrario, el AIC es mejor cuando su valor es menor, como sucede de nuevo en el modelo de la concordancia (1037) en relación con el criterio serológico del 2010 (1067). Esta última diferencia (>10) indica que se puede considerar sin ninguna duda que el modelo del 2010 se ajusta peor a los datos. En el modelo que combina los dos criterios se obtuvo una mejoría de estos parámetros todavía mayor (R^2 = 0.456, AIC = 1027). Por el contrario, ninguno de los modelos basados en la concordancia con otros anticuerpos, anti-AcLys (R^2 = 0.446, AIC = 1038) o anti-CarP (R^2 = 0.442, AIC = 1048), fue mejor que el modelo que incluyó a los anticuerpos anti-AcOrn.

2.5. MEJORA DE LA CLASIFICACIÓN DE LA AR CON LOS ANTICUERPOS ANTI-ACORN

La prueba final para verificar la contribución a la clasificación de la AR consiste en la combinación de los modelos serológicos con los componentes no serológicos de los criterios ACR/EULAR de la clasificación de la AR del 2010 (Tabla 27). Este análisis sólo fue posible en los pacientes de la cohorte PEARL (537 pacientes con EA) que disponían de todos los datos. Los resultados mostraron una mejora en la especificidad y la exactitud con la concordancia de anticuerpos anti-CCP, FR y anti-AcOrn. Con más detalle, la especificidad fue significativamente mayor que con los criterios del 2010 (77.6% *vs.* 72.6%, P = 0.003). Este aumento se vio acompañado de una sensibilidad nominalmente mayor (80.2% *vs.* 78.8%, P = 0.25) y una exactitud significativamente mejor (79.0% *vs.*75.8%, P = 0.002). Esta mejora no fue atribuible a la puntuación específica empleada ya que se replicó con los modelos de regresión logística en los que no se utilizan puntuaciones predeterminadas (Tabla 27; especificidad: 79.2% *vs.* 73.8%, $P = 9.5 \times 10^{-6}$; exactitud: 80.0% *vs.* 77.1%, P = 0.007). Otro resultado a destacar de estos análisis es que la clasificación que incorpora la combinación de

los criterios serológicos del 2010 y la concordancia (Ccdc. anti-AcOrn + 2010 en la Tabla 27) no fue mejor que la basada únicamente en la concordancia (Ccdc. Anti-AcOrn en la Tabla 27).

La mejoría en la clasificación de la AR con los anticuerpos anti-AcOrn fue significativamente mayor que la que se obtuvo con los anticuerpos anti-CarP descrita recientemente en un trabajo realizado en nuestro laboratorio [176] y que se muestra aquí para facilitar una comparación directa (Tabla 27; puntuación especificidad: 77.6% *vs.* 75.3%, *P* = 0.03 y exactitud: 79.0% *vs.* 77.1%, *P* = 0.01; regresión logística especificidad: 79.2% *vs.* 75.7%, *P* = 0.002 y exactitud: 80.0% *vs.* 77.8%, *P* = 0.01).

Tabla 27. Clasificación de los pacientes con AR empleando diferentes componentes serológicos. 2010 ACR/EULAR = FR o anticuerpos anti-CCP como se indica en los criterios de clasificación ACR/EULAR de la AR del 2010; Ccdc. Anti-AcOrn = concordancia para los anticuerpos anti-CCP, FR y anti-AcOrn; Ccdc. Anti-CarP = concordancia para los anticuerpos anti-CCP, FR y anti-CarP. La puntuación para cada nivel fue la que se indica en los criterios de clasificación ACR/EULAR de la AR del 2010 para el componente serológico 2010 ACR/EULAR y como se describe en Regueiro C y col.[176] dependiendo del número de anticuerpos concordantes: 5 puntos para 3 anticuerpos, 3 puntos para 2 anticuerpos y 1 punto para 1 anticuerpo para los componentes serológicos basados en la concordancia; o 5 puntos para 3 o 2 anticuerpos con títulos altos de anticuerpos anti-CCP o FR, 3 puntos para 3 o 2 anticuerpos con títulos bajos y 1 para 1 anticuerpo independientemente de los títulos para la combinación de los componentes serológicos del 2010 y la concordancia. La clasificación con los modelos de regresión se realizó incluyendo cada componente individual: afectación articular, serología, duración de los síntomas y reactantes de fase aguda con un punto de corte ajustado para obtener un 80% de sensibilidad. Este análisis es ligeramente diferente al que se indica en Regueiro C y col.[176] donde los factores del componente no serológico se agruparon en una única variable.

Componente serológico	**Puntuación**			**Regresión logística**	
	especificidad	sensibilidad	exactitud	especificidad	exactitud
2010 ACR/EULAR	72.6	78.8	75.8	73.8	77.1
Ccdc. anti-AcOrn	77.6	80.2	79.0	79.2	80.0
Ccdc. anti-AcOrn + 2010	77.6	81.3	79.5	80.3	80.6
Ccdc. Anti-CarP	75.3	78.8	77.1	75.7	77.8
Ccdc. Anti-CarP + 2010	76.4	80.6	78.8	79.5	80.0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS OXIDADOS CON MALONDIALDEHÍDO EN EL SUERO DE PACIENTES CON AR ESTABLECIDA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1. VERIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE ADUCTOS DE MAA

En primer lugar, se verificó que la estructura del hexil-MAA se correspondía con la estructura que presentan los aductos de malondialdehído-acetaldehído sobre las lisinas: 1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldehído. Para ello se comparó el espectro de H^1-RMN del hexil-MAA con datos previos existentes en la literatura [240]. En la Figura 13 se muestra el espectro de H^1-RMN obtenido para el hexil-MAA. Las señales en orden decreciente de valor δ son: H^1-RMN δ 9.2 (s), 6.6 (s), 3.9 (c), 3.4 (t), 1.2-1.8 (m), 1.1 (d), 0.9 (t) y se corresponden con los picos A-F. Estos valores obtenidos para el hexil-MAA sintetizado en nuestro laboratorio fueron idénticos a los publicados [240], que se muestran aquí para facilitar la comparación: H^1-RMN δ 9.2 (s, 2H, CHO), 6.6 (s, 2H, C=CH), 3.9 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CH–CH_3), 3.4 (t, J = 7.0 Hz, 2H, N–CH_2), 1.2-1.8 (m, 8H, $(CH_2)_4$), 1.1 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH_3–CH), 0.9 (t, J = 6.2 Hz, 3H, CH_3-CH), confirmando la correcta formación de la estructura 1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldehído en el hexil-MAA.

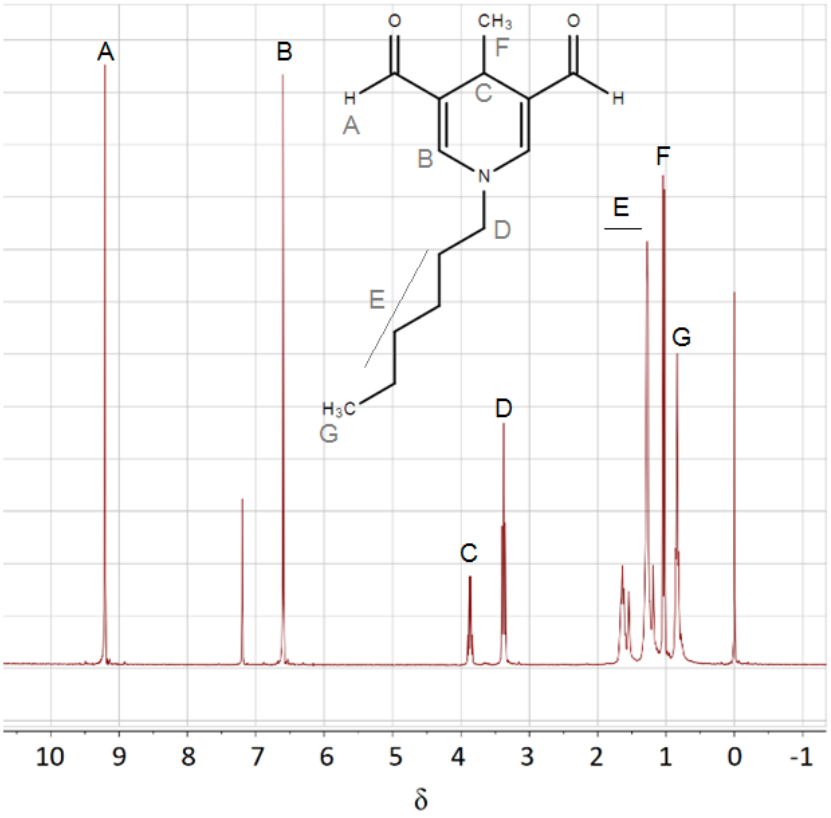


Figura 13. Espectro de H^1-RMN del compuesto hexil-MAA. En el eje de abscisas se muestran los desplazamientos químicos (δ) para cada átomo de H o grupo de H del compuesto hexil-MAA sintetizado en nuestro laboratorio que se encuentran en el mismo entorno químico. La altura de los picos representa la intensidad de la señal que es proporcional al número de átomos de H. Los hidrógenos en la imagen de la molécula hexil-MAA se identifican con las mismas letras mayúsculas que la señal que producen en el espectro. El pico sin letra se corresponde con la señal del disolvente. La multiplicidad de la señal se produce por la interacción entre el átomo o átomos de H que producen la señal y el átomo o átomos de H presentes en un carbono adyacente. Se expresa en función del número de picos de la señal que equivalen al número de átomos de H+1 que se encuentran en el carbono adyacente: s, singlete – 1 pico; d, doblete – 2 picos; t, triplete – 3 picos; c, cuadruplete – 4 picos; m, multiplete – 5 o más picos. La distancia entre los picos de una misma señal es proporcional a la interacción con los grupos de H en un carbono adyacente que provoca la multiplicidad y se expresa como una constante de acoplamiento *J* en hertzios (Hz) [326].

La formación de aductos de malondialdehído-acetaldehído tras la reacción de la HSA con malondialdehído y acetaldehído se verificó mediante el análisis del espectro de fluorescencia. El espectro de emisión de la HSA modificada se comparó con el de la HSA no modificada (Figura 14A). La MAA-HSA mostró un pico de emisión de fluorescencia ancho que abarcó desde los 430 nm hasta los 630 nm y cuyo máximo de emisión se observó a una longitud de onda de 470 nm, similar al descrito [240] y al observado para el hexil-MAA (Figura 14B). El resto del espectro fue solapable con el del estándar hexil-MAA mostrando la correcta identidad de los aductos. Por el contrario, la CTR-HSA no mostró fluorescencia significativa por encima de 430 nm y ningún pico a 470 nm. El ratio F/M 1.22±0.20 indicó un nivel adecuado de aducción de la MAA-HSA.

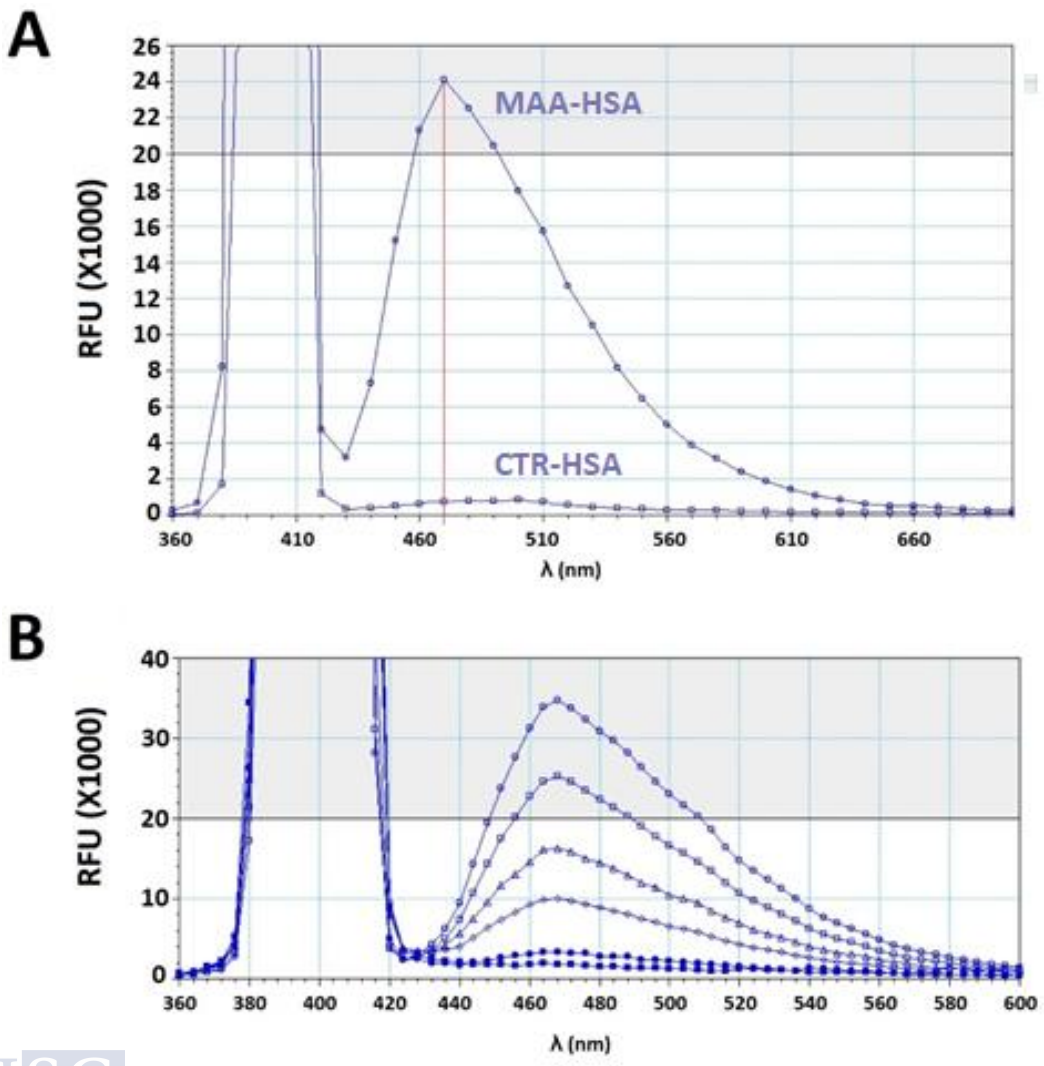


Figura 14. Espectros de emisión de fluorescencia de la MAA-HSA, la HSA no modificada (CTR-HSA) y de la curva de calibrado construida a partir del estándar hexil-MAA. El gráfico A muestra los espectros de emisión superpuestos de la MAA-HSA y la CTR-HSA. La línea roja indica la longitud de onda de máxima emisión de la MAA-HSA. El gráfico B muestra los espectros de emisión superpuestos de las diferentes diluciones del hexil-MAA, siendo la más concentrada de 20 mg/mL (mayor emisión de fluorescencia) y el resto diluciones seriadas de ½.

3.2. ANTICUERPOS ANTI-MAA EN PACIENTES CON AR Y CONTROLES

Los niveles de anticuerpos frente a MAA se evaluaron en las muestras de suero de 517 pacientes con AR del Hospital Clínico Universitario de Santiago y 272 controles sanos empleando como antígeno en el ELISA MAA-HSA modificada con un ratio malondialdehído:acetaldehído de 2:1 [HSA-MAA (2:1)]. Los tres isotipos IgG, IgM e IgA de los anticuerpos anti-MAA mostraron niveles ligeramente superiores en el suero de los pacientes con AR que en los controles sanos (Figura 15 y Tabla 28).

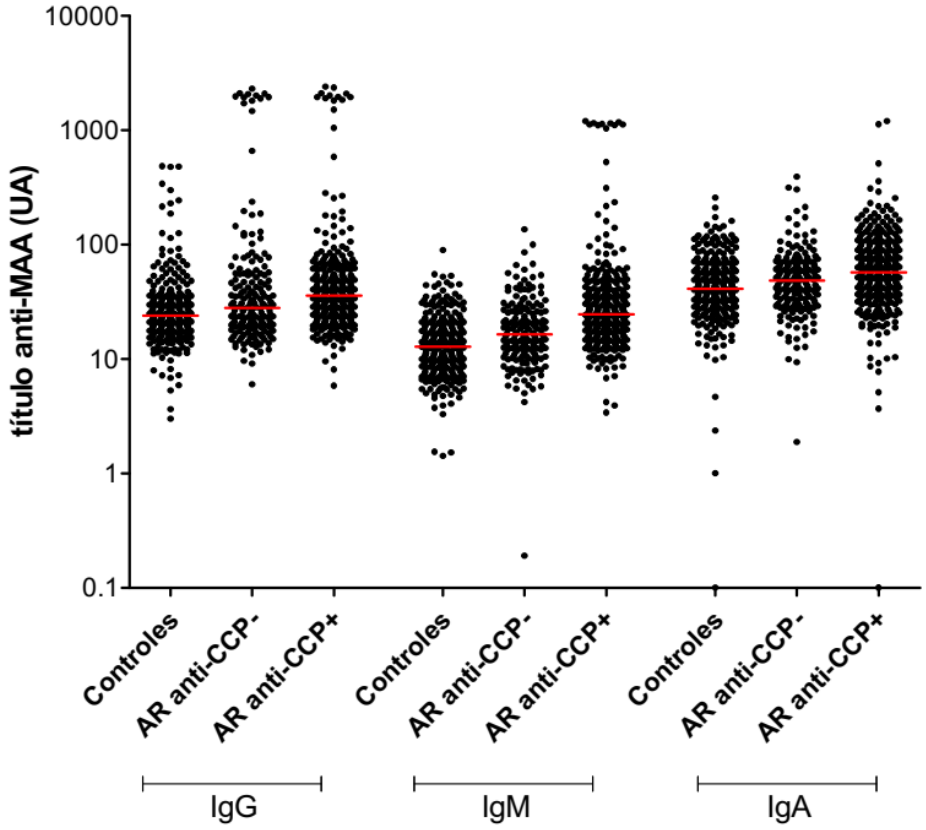


Figura 15. Títulos de los anticuerpos anti-MAA estratificados por el isotipo en pacientes con AR y controles sanos empleando MAA-HSA (2:1) como antígeno. Los títulos se muestran en escala logarítmica. Los pacientes con AR se han dividido en función de la presencia de los anticuerpos anti-CCP. Las líneas horizontales rojas representan la mediana de los títulos de anticuerpo en cada grupo.

En los pacientes con AR, los títulos de anticuerpos anti-MAA estaban significativamente más elevados en el subgrupo anti-CCP positivo en comparación con el subgrupo anti-CCP negativo (Figura 15 y Tabla 28). La comparación entre los pacientes con AR anti-CCP negativos y los controles mostró que los niveles de anticuerpos IgA anti-MAA fueron similares en los dos grupos, mientras que los niveles de los isotipos IgG e IgM estaban aumentados en el subgrupo anti-CCP negativo.

Tabla 28. Frecuencia y niveles de los anticuerpos IgG, IgM e IgA anti-MAA en los controles sanos, en todos los pacientes con AR y en los pacientes estratificados en función de la presencia de los anticuerpos anti-CCP. Los títulos (UA) de los anticuerpos anti-MAA se expresan como la mediana (IQR) mientras que la frecuencia de pacientes positivos se expresa en porcentaje (%). El primer valor de *P* corresponde a la comparación entre todos los pacientes con AR y los controles sanos. El segundo valor de *P* muestra la comparación de los dos subgrupos de pacientes con AR en función de la presencia de los anticuerpos anti-CCP y el tercero muestra la comparación entre los pacientes anti-CCP negativos y los controles.

Isotipo anti-MAA	Controles	AR	$P_{Controles\ vs.\ AR}$	AR anti-CCP-	AR anti-CCP+	$P_{anti\text{-}CCP+\ vs.\ anti\text{-}CCP-}$	$P_{anti\text{-}CCP-\ vs.\ controles}$
Título							
IgG	23.9 (17.2-34.4)	32.6 (21.3-52.6)	$3.1x10^{-11}$	27.8 (19.2-51.5)	35.7 (23.6-52.7)	$3.0x10^{-3}$	$2.4x10^{-3}$
IgM	12.9 (8.2-19.5)	21.1 (14.1-34.0)	$8.4x10^{-26}$	16.4 (11.5-25.3)	24.6 (16.5-38.3)	$1.9x10^{-12}$	$1.1x10^{-5}$
IgA	41.3 (28.9-62.1)	53.5 (35.0-79.4)	$1.7x10^{-6}$	48.2 (30.9-66.9)	57.1 (37.1-89.6)	$2.7x10^{-4}$	0.09
Frecuencia							
IgG positivo	6/272 (2.2)	31/517 (6.0)	$1.7x10^{-2}$	13/185 (7.0)	18/332 (5.4)	0.46	0.02
IgM positivo	6/272 (2.2)	76/515 (14.8)	$4.2x10^{-8}$	11/185 (5.9)	65/330 (19.7)	$2.0x10^{-5}$	$4.5x10^{-2}$
IgA positivo	6/272 (2.2)	37/512 (7.2)	$3.3x10^{-3}$	8/184 (4.3)	29/328 (8.8)	0.06	0.27

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Treinta y un pacientes con AR (6.0%) fueron positivos para los anticuerpos anti-MAA del isotipo IgG, 76 (14.8%) para el IgM y 37 (7.2%) para el IgA. Estas frecuencias son inferiores a las descritas en los pacientes con AR del registro VARA [32] y en los pacientes con AR de la colección VAMC [39]. Las frecuencias de los tres isotipos en esta última colección [39] también fueron inferiores a las descritas en el registro VARA, aunque la magnitud de la diferencia fue más marcada en nuestros pacientes (Tabla 29). En la cohorte EIRA sólo se evaluó el isotipo IgG de los anticuerpos anti-MAA, que también mostró una prevalencia superior en comparación con la observada en nuestra colección. Las características clínicas de los pacientes con AR de la colección de Santiago, del registro VARA, de la colección VAMC y de la cohorte EIRA se muestran en la Tabla 29. Cabe destacar que las cuatro colecciones de pacientes con AR muestran diferencias considerables en las características clínicas y serológicas. La colección de Santiago estaba conformada principalmente por mujeres y no fumadores de ascendencia europea (españoles) con una menor frecuencia de alelos del epítopo compartido y un mayor tiempo de evolución de la enfermedad. Además, la frecuencia de seropositivos para el FR fue menor que la descrita en las otras colecciones, mientras que la frecuencia de seropositivos para los anticuerpos anti-CCP fue menor en comparación con las dos colecciones estadounidenses, pero comparable a la observada en la cohorte EIRA (Tabla 29). La cohorte EIRA mostró características más similares a las de la colección de Santiago: mayoría de mujeres y de pacientes con ascendencia europea aunque no se dispone del dato exacto para los pacientes incluidos en el estudio de los anticuerpos anti-MAA. Por el contrario, el registro VARA y la colección VAMC estaban formadas predominantemente por hombres fumadores con un significativo componente de minorías étnicas de origen no europeo (Tabla 29).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 29. Características clínicas y serológicas de los pacientes con AR de cuatro colecciones en los que se han evaluado los anticuerpos anti-MAA. Las variables edad y tiempo de evolución se representan como la media y la DS mientras que el resto de variables se representan como porcentaje (%). La frecuencia de pacientes con AR considerados positivos para cada isotipo de los anticuerpos anti-MAA se determinó empleando el punto de corte establecido en cada estudio: nuestro estudio (Santiago) percentil 98; en el estudio de Thiele *y col.* [32] (VARA) valor medio más 2.5 veces la DS; en el estudio de Mikuls *y col.* [39] (VAMC) percentil 95; en el estudio de Grönwall *y col.* [204] (EIRA) percentil 85. Los datos de hábito tabáquico, frecuencia de anticuerpos anti-CCP y FR y frecuencia del EC para la colección VAMC se obtuvieron del trabajo realizado por Mikuls *y col.* [103] de 287 pacientes con AR. Dato disponible para <98% de los pacientes con AR del presente estudio: tiempo de evolución 95.7%, fumadores 92.3%, erosiones 95.2% y FR 95.9%. El primer valor de *P* se muestra para la comparación entre las colecciones de Santiago y VARA, el segundo valor de *P* para la comparación entre Santiago y VAMC, el tercer valor de *P* para la comparación entre Santiago y EIRA y el cuarto valor de *P* para la comparación entre VARA y VAMC.

Características	**Santiago (n = 517)**	**VARA (n = 1720)**	**VAMC (n = 285)**	**EIRA (n = 403)**	***P*** *Santiago vs. VARA*	***P*** *Santiago vs. VAMC*	***P*** *Santiago vs. EIRA*	***P*** *VARA vs. VAMC*
Ascendencia europea	100	78	75	-	$1.9x10^{-32}$	$4.6x10^{-33}$	-	0.30
Edad, años	61 (14)	63 (11)	59 (12)	50 (13)	$7.0x10^{-4}$	0.04	$<1.0x10^{-4}$	$<1.0x10^{-4}$
Tiempo de evolución, años	14 (11)	12 (12)	13 (10)	-	$9.0x10^{-4}$	0.21	-	0.18
Mujeres	77	9	37	70	$2.1x10^{-214}$	$4.6x10^{-29}$	0.02	$7.8x10^{-38}$
Fumadores								
Nunca	80	20	38	28	ref	ref	ref	ref
Previo	11	53	43	72	$5.0x10^{-65}$	$9.0x10^{-27}$	$6.1x10^{-53}$	$1.0x10^{-3}$
Actual	10	26	19		$5.5x10^{-13}$	$1.0x10^{-3}$		$9.1x10^{-3}$
EC, portador	58	-	76	77	-	$2.1x10^{-7}$	$7.6x10^{-10}$	-
FR positivo	60	80	77	71	$1.1x10^{-18}$	$2.4x10^{-6}$	$1.0x10^{-3}$	0.27
anti-CCP positivo	64	78	85	69	$3.3x10^{-10}$	$6.9x10^{-10}$	0.13	$6.3x10^{-4}$
IgG anti-MAA positivo	6	92	80	44	$1.1x10^{-319}$	$4.4x10^{-102}$	$5.4x10^{-42}$	$2.6x10^{-10}$
IgM anti-MAA positivo	15	38	18	-	$5.3x10^{-23}$	0.24	-	$4.3x10^{-11}$
IgA anti-MAA positivo	7	73	52	-	$1.9x10^{-154}$	$1.5x10^{-46}$	-	$6.1x10^{-13}$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En nuestro estudio, los anticuerpos IgM anti-MAA se detectaron con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con AR anti-CCP positivo en comparación con el subgrupo anti-CCP negativo, mientras que el isotipo IgA mostró una tendencia hacia una mayor prevalencia en el subgrupo anti-CCP positivo (P = 0.06, Tabla 28). En línea con lo observado en todos los pacientes con AR, la prevalencia de los anticuerpos anti-MAA descrita en los pacientes anti-CCP positivos varió considerablemente entre las cuatro colecciones, con los valores más bajos observados en la colección de Santiago (Tabla 30, P $<1.0x10^{-12}$ para todas las comparaciones *vs.* Santiago excepto para la comparación del isotipo IgM de VAMC *vs.* Santiago; *P* = 0.38). Una situación similar se observó en el subgrupo anti-CCP negativo en el que la necesidad de encontrar biomarcadores es más urgente. Mientras que la prevalencia de los anticuerpos anti-MAA en los pacientes anti-CCP negativos del registro VARA fue del 29-88%, en la colección VAMC del 18-66% dependiendo del isotipo evaluado y en la colección de EIRA fue del 33% para el isotipo IgG, en nuestros pacientes ninguno de los tres isotipos se encontró en una frecuencia superior al 10% (Tabla 30, P <0.02 para todas las comparaciones *vs.* Santiago).

Tabla 30. Prevalencia de los anticuerpos anti-MAA en cuatro colecciones de pacientes con AR estratificados en función de la presencia de los anticuerpos anti-CCP. Las variables se representan como porcentaje (%). La frecuencia de pacientes con AR considerados positivos para cada isotipo de los anticuerpos anti-MAA se determinó como de describe en la Tabla 29. Los datos de frecuencia de anticuerpos anti-CCP para la colección VAMC se obtuvieron del trabajo realizado por Mikuls *y col.* [103] de 287 pacientes con AR.

	Anti-CCP positivo				**Anti-CCP negativo**			
Características	**Santiago (n = 332)**	**VARA (n = 1340)**	**VAMC (n = 244)**	**EIRA (n = 278)**	**Santiago (n = 185)**	**VARA (n = 380)**	**VAMC (n = 41)**	**EIRA (n = 125)**
IgG anti-MAA positivo	5	93	83	49	7	88	66	33
IgM anti-MAA positivo	20	41	17	-	6	29	18	-
IgA anti-MAA positivo	9	76	52	-	4	63	52	-

3.3. ANTICUERPOS ANTI-MAA DERIVADOS DE DOS PREPARACIONES DIFERENTES

La baja prevalencia de los anticuerpos anti-MAA en los pacientes con AR de Santiago podría deberse a un nivel subóptimo de modificación. Aunque el antígeno MAA-HSA (2:1) mostró un ratio F/M suficiente para considerarlo correctamente modificado, se probó a utilizar una preparación con un mayor nivel de aducción. Por lo tanto, se modificó la HSA aumentando la cantidad de malondialdehído a 4 mM y manteniendo el acetaldehído a 1 mM, lo que resultó en un ratio F/M = 1.68 ± 0.07 [294]. Empleando como antígeno esta nueva preparación [HSA-MAA (4:1)] se determinaron los anticuerpos anti-MAA del isotipo IgG con un anticuerpo secundario frente a IgG (H+L) en el suero de pacientes con AR y controles sanos seleccionados al azar en los que se habían determinado los anticuerpos empleando el antígeno modificado 2:1. No se encontró ninguna diferencia en el porcentaje de pacientes con AR positivos para los anticuerpos anti-MAA del isotipo IgG (8.3% con ambos antígenos), por lo

que un mayor nivel de aducción del antígeno no aumentó su habilidad para capturar los anticuerpos IgG anti-MAA.

El efecto del nivel de aducción en la detección de anticuerpos anti-MAA también se evaluó para los isotipos IgM e IgA, dando lugar a resultados diferentes. Por un lado, la prevalencia de los anticuerpos IgM anti-MAA se vio disminuida considerablemente cuando se empleó como antígeno la MAA-HSA (4:1), pasando de un 12.5% con la MAA-HSA (2:1) a un 2.1%. En cambio, los anticuerpos IgA anti-MAA mostraron una prevalencia similar (6.3%) independientemente del antígeno utilizado en el ELISA, tal y como se observó para el isotipo IgG.

3.4. ANTICUERPOS ANTI-MDA EN PACIENTES CON AR Y CONTROLES

En el presente trabajo también se ha estudiado la presencia de anticuerpos IgG e IgM que reconocen otros aductos derivados de la modificación con malondialdehído (anticuerpos anti-MDA) que habían sido descritos previamente en pacientes con AR [33]. Para ello se emplearon las mismas muestras de suero de pacientes con AR y controles del Hospital Clínico de Santiago en las que se evaluaron los anticuerpos anti-MAA. Los anticuerpos anti-MDA mostraron niveles superiores para los dos isotipos evaluados en los pacientes con AR en comparación con los mostrados en los controles sanos (Figura 16 y Tabla 31). Los niveles de anticuerpos anti-MDA estaban incrementados en los pacientes con AR del subgrupo anti-CCP positivo en comparación con el subgrupo anti-CCP negativo. Sin embargo, esto no se tradujo en una mayor prevalencia de anticuerpos anti-MDA en los pacientes seropositivos (Tabla 31). A pesar de esta tendencia, tanto el título como la frecuencia de los isotipos IgG e IgM fueron superiores en los pacientes con AR anti-CCP negativos que en los controles sanos.

De nuestros pacientes con AR, 43 (8.3%) fueron positivos para el isotipo IgG y 86 (16.6%) para el isotipo IgM de los anticuerpos anti-MDA. La sensibilidad del isotipo IgM fue comparable al observado en los 162 pacientes con AR de un estudio previo [33]. Por el contrario, los anticuerpos anti-MDA de isotipo IgG mostraron una frecuencia considerablemente menor en los pacientes de Santiago en comparación con el 28% detectado en el estudio anterior.

La comparación directa de las características clínicas de nuestros pacientes y de los 162 pacientes con AR del estudio previo no fue posible porque los datos no se encuentran disponibles [33].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

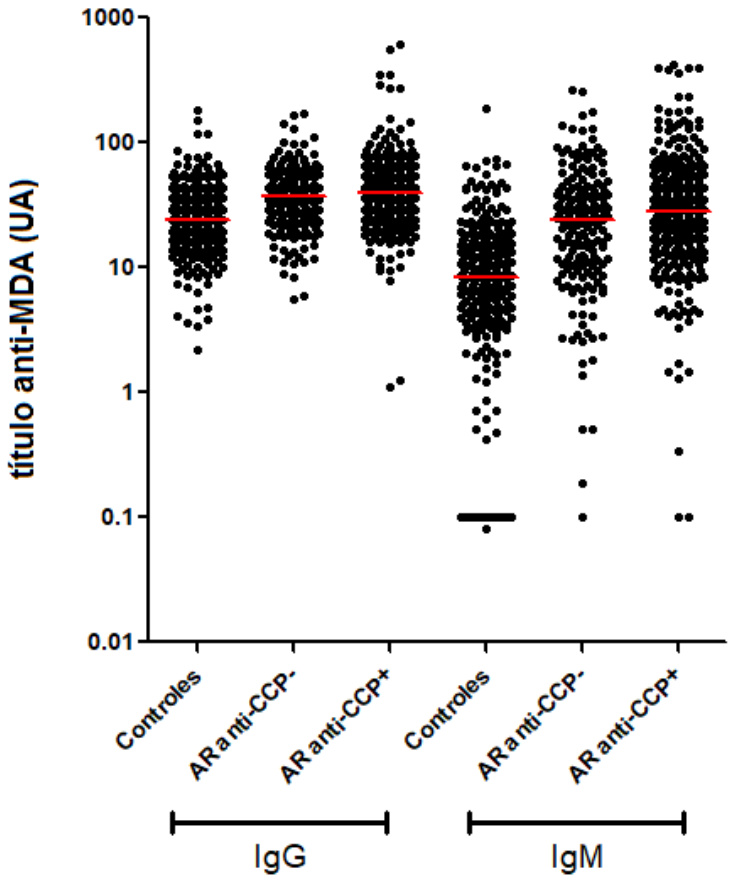


Figura 16. Títulos de los anticuerpos anti-MDA estratificados por el isotipo en pacientes con AR y controles sanos incluidos en el presente estudio empleando MDA-BSA como antígeno. Los títulos se muestran en escala logarítmica. Los pacientes con AR se han dividido en función del estado para los anticuerpos anti-CCP. Las líneas horizontales rojas representan la mediana de los títulos de anticuerpo en cada grupo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 31. Frecuencia y niveles de los anticuerpos IgG e IgM anti-MDA en los controles sanos, en todos los pacientes con AR y en los pacientes estratificados en función de la presencia de los anticuerpos anti-CCP. Los títulos (UA) de los dos isotipos de anticuerpos anti-MDA se expresan como la mediana (IQR) mientras que la frecuencia de pacientes positivos se expresa en porcentaje (%). El primer valor de *P* corresponde a la comparación entre todos los pacientes con AR y los controles sanos. El segundo valor de *P* resulta de la comparación de los dos subgrupos anti-CCP de pacientes con AR y el tercero muestra los valores obtenidos para la comparación entre los pacientes anti-CCP negativos y los controles.

Isotipo anti-MDA	**Controles**	**AR**	$P_{Controles\ vs.\ AR}$	**AR anti-CCP-**	**AR anti-CCP+**	$P_{anti\text{-}CCP+\ vs.\ anti\text{-}CCP-}$	$P_{anti\text{-}CCP-\ vs.\ controles}$
Título							
IgG	24.1 (16.3-36.5)	38.7 (25.6-55.1)	$3.4x10^{-22}$	36.8 (24.4-51.3)	40.1 (26.9-56.7)	$4.8x10^{-2}$	$6.1x10^{-11}$
IgM	8.4 (3.9-16.5)	26.2 (13.9-46.2)	$4.9x10^{-41}$	24.4 (10.9-40.8)	27.8 (16.8-49.1)	$1.2x10^{-2}$	$6.9x10^{-20}$
Frecuencia							
IgG positivo	6/271 (2.2)	43/517 (8.3)	$7.5x10^{-4}$	12/185 (6.5)	31/332 (9.3)	0.26	0.03
IgM positivo	6/271 (2.2)	86/517 (16.6)	$2.1x10^{-9}$	26/185 (14.1)	60/332 (18.1)	0.24	$1.2x10^{-6}$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5. RELACIÓN ENTRE LOS ANTICUERPOS ANTI-MAA Y ANTI-MDA

La relación entre los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA no ha sido directamente explorada a pesar de que los dos tienen como diana aductos formados por vías compartidas. Por ello analizamos su concordancia en estado y correlación en títulos considerando todos los isotipos analizados en nuestras muestras.

Las concordancias más elevadas en la comparación por separado de los anticuerpos anti-MAA y los anti-MDA se observaron entre isotipos de anticuerpos con la misma especificidad. Así, una fracción importante de los pacientes con AR mostró el mismo estado para los dos isotipos, IgG e IgM, de los anticuerpos anti-MDA ($\gamma = 0.76$, Tabla 32) y entre los isotipos IgG e IgA de los anticuerpos anti-MAA ($\gamma = 0.78$). Cuando se comparó el estado de los anticuerpos anti-MDA y anti-MAA, se observó una concordancia notable entre aquellos que presentaban el mismo isotipo (Tabla 32). En la comparación de anticuerpos con isotipos distintos hubo menos pacientes con el mismo estado, aunque la mayoría de estas comparaciones alcanzaron valores de concordancia estadísticamente significativos Sin embargo, este solapamiento en estado no fue superior al mostrado entre otros anticuerpos específicos de la AR, como los anticuerpos anti-CCP y el FR ($\gamma = 0.82$) o con los anticuerpos anti-CarP.

El análisis de la correlación de los títulos se restringió a los pacientes positivos lo que redujo notablemente el número de pacientes incluido en cada comparación. Aun así, los dos isotipos de los anticuerpos anti-MDA se encontraron positivamente correlacionados de forma significativa, al igual que los títulos de los anticuerpos IgG anti-MDA e IgA anti-MAA. Sin embargo, el resto de las comparaciones de anticuerpos no resultaron en correlaciones significativas, incluso aquellas que mostraron mayor concordancia en estado (Tabla 32). Esta falta de correlación en los títulos entre los anticuerpos anti-MDA y anti-MAA y especialmente la tendencia a correlaciones inversa entre IgG anti-MDA y anti-MAA indica que se tratan de dos sistemas de autoanticuerpos independientes y no cros-reactivos.

En relación con otros autoanticuerpos de la AR, los dos isotipos de los anticuerpos anti-MDA mostraron concordancia con el FR y los anticuerpos anti-CarP pero no con los anti-CCP. Por su parte, los isotipos IgM e IgA de los anticuerpos anti-MAA mostraron concordancias significativas con los tres autoanticuerpos, FR, anti-CCP y anti-CarP, mientras que los de isotipo IgG no fueron concordantes con ninguno de ellos (Tabla 32). A pesar de la presencia de valores de concordancia significativos en algunas de estas comparaciones, los títulos de los anticuerpos anti-CCP y anti-CarP no se correlacionaron con los títulos de los anticuerpos anti-MDA ni de los anti-MAA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 32. Relaciones entre los anticuerpos anti-MDA y anti-MAA, y de éstos con los autoanticuerpos FR, anti-CCP y anti-CarP. Los anticuerpos se han considerados en pares evaluando la concordancia de estado y la correlación de títulos. El parámetro γ se refiere al coeficiente gamma de Goodman y Kruskal mientas que ρ es el coeficiente de correlación de Spearman. No se dispone de valor de título para FR por lo que no se ha podido calcular el coeficiente ρ. Ab = anticuerpo. na = no aplicable.

1er Ab	2º Ab	n	γ	*P*	n	ρ	*P*
Anti-MDA							
IgG	IgM anti-MDA	517	0.76	$4.0x10^{-24}$	23	0.64	$1.1x10^{-3}$
IgG	IgG Anti-MAA	517	0.57	$9.2x10^{-6}$	7	-0.64	0.12
IgM	IgM Anti-MAA	515	0.56	$1.0x10^{-12}$	27	0.00	0.99
IgG	IgM Anti-MAA	515	0.49	$3.9x10^{-6}$	13	-0.19	0.54
IgG	IgA Anti-MAA	512	0.42	$4.3x10^{-3}$	6	0.94	$4.8x10^{-3}$
IgM	IgA Anti-MAA	512	0.39	$8.7x10^{-4}$	11	-0.05	0.87
IgM	IgG Anti-MAA	517	0.20	0.17	7	0.07	0.88
Anti-MAA							
IgM	IgA Anti-MAA	512	0.78	$1.1x10^{-22}$	19	0.10	0.69
IgG	IgM Anti-MAA	515	0.52	$9.9x10^{-6}$	10	0.21	0.56
IgG	IgA Anti-MAA	512	0.48	$2.1x10^{-3}$	5	0.10	0.87
Anticuerpos en la AR							
Anti-CCP	FR	496	0.82	$4.0x10^{-63}$	-	na	na
Anti-CCP	Anti-CarP	517	0.60	$2.2x10^{-19}$	131	0.09	0.29
FR	Anti-CarP	496	0.55	$6.9x10^{-17}$	-	na	na
Anti-MDA	**Anticuerpos en la AR**						
IgM	FR	496	0.39	$4.6x10^{-6}$	-	na	na
IgG	Anti-CarP	517	0.36	$3.3x10^{-4}$	20	-0.31	0.18
IgM	Anti-CarP	517	0.32	$2.9x10^{-5}$	37	-0.05	0.77
IgG	FR	496	0.30	$9.5x10^{-3}$	-	na	na
IgG	Anti-CCP	517	0.20	0.09	31	0.12	0.52
IgM	Anti-CCP	517	0.15	0.08	60	-0.03	0.82
Anti-MAA	**Anticuerpos en la AR**						
IgM	Anti-CCP	515	0.59	$2.8x10^{-10}$	65	-0.01	0.91
IgM	FR	494	0.55	$1.3x10^{-9}$	-	na	na
IgM	Anti-CarP	515	0.53	$3.7x10^{-13}$	41	0.20	0.20
IgA	Anti-CarP	512	0.50	$1.0x10^{-6}$	20	-0.15	0.52
IgA	FR	491	0.47	$2.2x10^{-4}$	-	na	na
IgA	Anti-CCP	512	0.36	$4.9x10^{-3}$	29	0.10	0.59
IgG	Anti-CarP	517	0.20	0.12	12	-0.14	0.66
IgG	Anti-CCP	517	-0.14	0.27	18	0.11	0.66
IgG	FR	496	-0.15	0.25	-	na	na

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se exploró por separado la relación entre los isotipos de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA en los pacientes con AR seropositivos y seronegativos en función de anti-CCP y FR. En el subgrupo de pacientes seropositivos (anti-CCP+ y/o FR+) se detectó un modesto nivel de solapamiento (< 30% de los positivos) entre los isotipos de los anticuerpos anti-MAA (Figura 17A). Los pacientes positivos sólo para el isotipo IgM conformaron el grupo más grande, representando cerca del 50% de todos los pacientes anti-MAA positivos, seguido del subgrupo de pacientes IgM/IgA doble positivos, lo que refleja la elevada concordancia detectada para estos dos isotipos. En los pacientes seronegativos, la distribución fue bastante diferente, con escaso solapamiento y una frecuencia más igualada de los tres isotipos (Figura 17B).

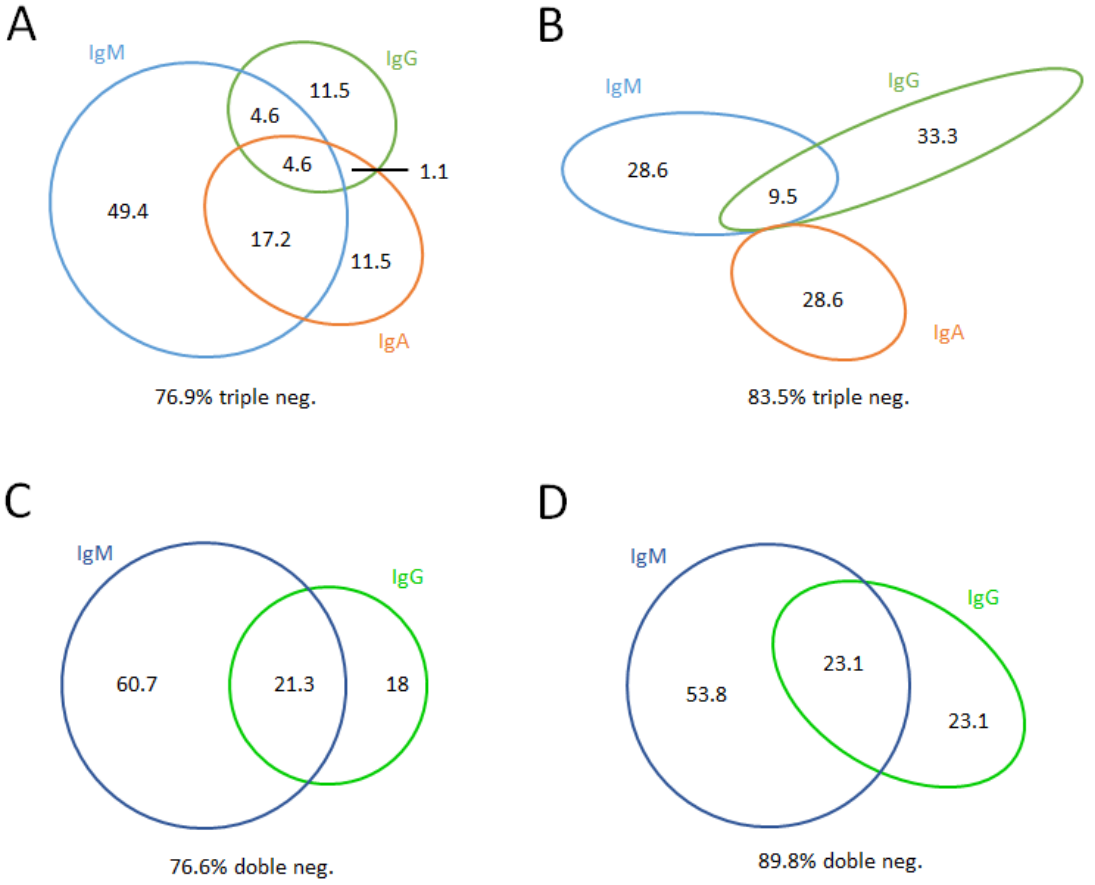


Figura 17. Frecuencia relativa de los tres isotipos de los anticuerpos anti-MAA y de los dos isotipos de los anticuerpos anti-MDA en los pacientes con AR. Los diagramas de Venn representando los isotipos IgG, IgM e IgA de los anticuerpos anti-MAA se muestran en las figuras A y B, mientras que los de los isotipos IgG e IgM de los anticuerpos anti-MDA se muestran en las figuras C y D. Las figuras A y C representan los pacientes con AR seropositivos (anti-CCP+ y/o FR+), mientras que las figuras B y D muestran los pacientes con AR seronegativos (anti-CCP- y FR-). Las áreas de las elipses y los porcentajes son proporcionales a la fracción de pacientes positivos, mientras que en el margen inferior se muestra el porcentaje del total de pacientes que eran negativos para todos los anticuerpos considerados.

Los isotipos de los anticuerpos anti-MDA mostraron una distribución similar en los pacientes con AR seropositivos y seronegativos (Figura 17C y D). En ambos subgrupos, los pacientes positivos sólo para el isotipo IgM conformaron el estrato mayoritario (60.7% y 53.8% en los pacientes con AR seropositivos y seronegativos respectivamente), seguidos son similar frecuencias por los que presentaban solo el isotipo IgG o los dos isotipos.

Por último, se analizó de forma específica la presencia de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA en los pacientes seronegativos (anti-CCP-/FR-). Los anticuerpos anti-MAA (isotipo IgG y/o IgM y/o IgA) fueron más abundantes, 16.5%, que los anti-MDA (isotipo IgG y/o IgM), 10.2%, aunque esta diferencia no fue significativa (*P* McNemar = 0.2). En conjunto, los dos tipos de anticuerpos se detectaron en el 25.2% de los pacientes seronegativos, una fracción significativamente mayor que la detectada únicamente con los anticuerpos anti-MAA (*P* McNemar = 0.003).

3.6. RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MAA Y ANTI-MDA CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y SEROLÓGICAS

Para completar el análisis se ha explorado la posible correlación y asociación de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA con algunas características de la AR. El único resultado significativo ha sido que la presencia de los anticuerpos IgM anti-MAA se asoció con el tabaquismo (OR = 2.81; 95% CI = 1.39-5.72; $P = 4.1x10^{-3}$) en el análisis incluyendo sexo, edad de diagnóstico y tiempo de evolución como covariables. Además, los pacientes con AR fumadores presentaron una prevalencia y unos títulos más altos de estos anticuerpos IgM anti-MAA que los no fumadores (25.8% *vs.* 12.2% respectivamente; $P = 8.0x10^{-4}$; mediana [IQR] = 27.3 [17.8-48.7] *vs.* 20.3 [13.3-31.9]; $P = 2.2x10^{-4}$). La magnitud de la asociación se incrementó cuando se consideraron los pacientes que seguían fumando (OR = 3.04; 95% CI = 1.22-7.56; $P = 1.7x10^{-2}$) en comparación con los habían dejado de fumar (OR = 1.95; 95% CI = 1.22-3.12; $P = 5.4x10^{-3}$), aunque los niveles y la prevalencia de los anticuerpos IgM anti-MAA no fueron significativamente diferentes entre estos dos subgrupos de pacientes. Por otra parte, no se observaron asociaciones entre la presencia de los anticuerpos anti-MAA o anti-MDA y la presencia del EC, el alelo de riesgo *PTPN22* o la presencia de erosiones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CARBONILADAS, NITRADAS Y HOMOCISTEINILADAS EN PACIENTES CON AR TEMPRANA Y ESTABLECIDA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1. VERIFICACIÓN DE LA CARBONILACIÓN DE CII Y BSA

La carbonilación del CII y de la BSA se verificó mediante varias técnicas: SDS-PAGE, análisis de fluorescencia y ensayo con DNPH, cada una de ellas aportando información relevante acerca de la integridad de la estructura de la proteína, la naturaleza de la modificación química y el nivel de modificación. A continuación, se detallan los hallazgos obtenidos con cada una de las técnicas.

El análisis con SDS-PAGE reveló algunos cambios en la migración de las proteínas tras las reacciones de carbonilación (Figura 18). El CII nativo mostró una banda principal en torno a 130 kilodaltons (kDa), así como algunos agregados de alto peso molecular. Por trabajos previos se sabe que la banda principal se corresponde con la cadena α del CII bovino, que muestra un peso molecular aparente mayor a su peso molecular (95 kDa) [30,327]. La reacción del HOCl con el CII no produjo ningún cambio estructural que fuera detectable mediante SDS-PAGE. Por el contrario, la glicación con ribosa mostró un cambio en la movilidad electroforética de la banda principal del CII hacia un peso molecular aparente mayor. Este cambio en la movilidad ya ha sido descrito y se debe a la unión covalente de moléculas de ribosa a las cadenas α del CII, ya que en las primeras etapas del proceso de glicación los azúcares forman bases de Schiff con los amino ácidos [328]. La baja intensidad de las bandas detectadas por debajo de 130 kDa reveló un escaso nivel de fragmentación del CII tras las reacciones de carbonilación. Por su parte, la BSA nativa mostró una banda principal de aproximadamente 72 kDa que corresponde con su peso molecular. La reacción con HOCl provocó una disminución en la intensidad de la banda principal y la aparición de una extensión y pérdida de definición de la banda lo que indica un aumento de la heterogeneidad molecular incluyendo cierto nivel de fragmentación tras la oxidación con HOCl. La modificación con ribosa provocó un cambio en la movilidad electroforética de la banda hacia pesos moleculares aparentes más altos que se interpretan como resultado de la formación de bases de Schiff como para el CII. A diferencia de la reacción con HOCl, la glicación con ribosa no produjo un aumento notable de la heterogeneidad molecular de la BSA.

El análisis de fluorescencia demostró que se habían producido cambios estructurales en el CII y en la BSA tras su carbonilación tanto con HOCl como con ribosa y que estos cambios tuvieron características distintas dependiendo de la proteína y la reacción. Se estudiaron tres patrones de emisión de fluorescencia tras excitar a 295 nm para analizar el mantenimiento de la estructura de las proteínas, y excitar a 335 nm que refleja los productos de tipo pentosidina (PTP) que se originan por la reacción de carbonilación, y la emisión tras excitar a 370 nm para evaluar la generación de AGE. Estos análisis mostraron que la estructura del CII se modificó más tras la reacción con ribosa que con HOCL (Figura 19, triptófano), que estas transformaciones no incluyeron una generación significativa de PTP, pero sí un aumento de los AGE (Figura 19). Este aumento de la intensidad de fluorescencia emitida a 425 nm fue de 1.4 veces respecto de la proteína sin modificar tras la reacción con HOCL, mientras que la modificación con ribosa aumentó 2.3 veces la intensidad específica de AGEs (Figura 19). Se debe señalar que el CII control ya mostraba evidencia de PTP mientras que no mostró ninguna señal correspondiente a la presencia de AGEs.

Los cambios observados en la BSA tras las reacciones de carbonilación fueron mucho más marcados (Figura 19).

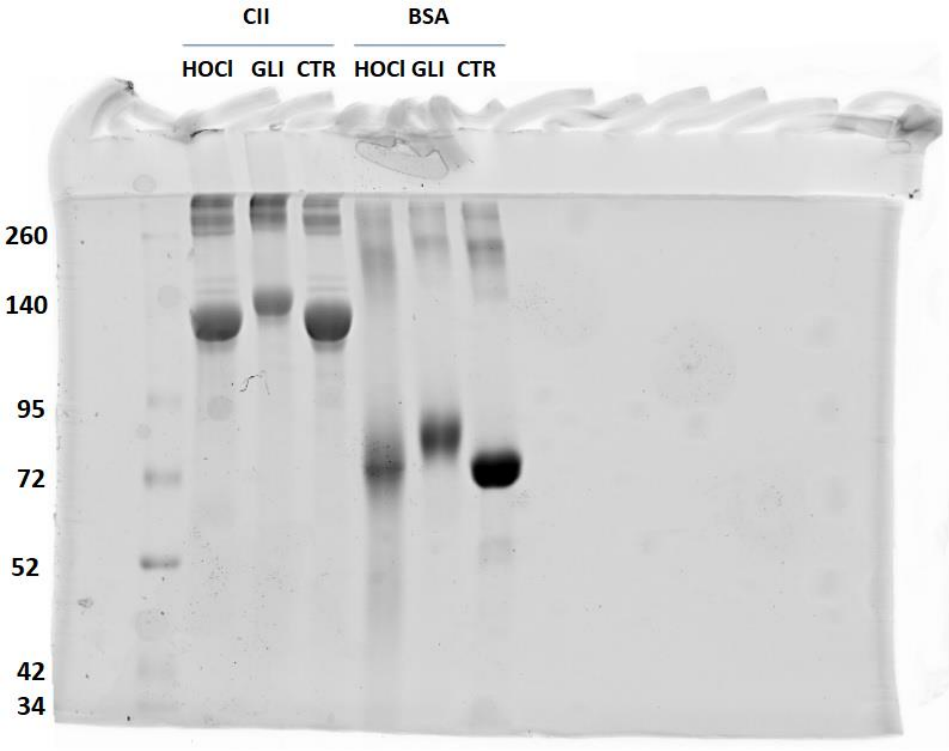


Figura 18. Movilidad electroforética del CII y la BSA carbonilados con HOCl o ribosa. Los números de la izquierda indican el peso molecular (kDa) de las bandas del marcador. La reacción con HOCl se indica con el prefijo HOCl-, la reacción con ribosa con GLI- y la reacción control sin agente oxidante con CTR- delante de la proteína. El orden de las muestras de izquierda a derecha es: marcador de peso molecular, HOCl-CII, GLI-CII, CTR-CII, HOCl-BSA, GLI-BSA, CTR-BSA.

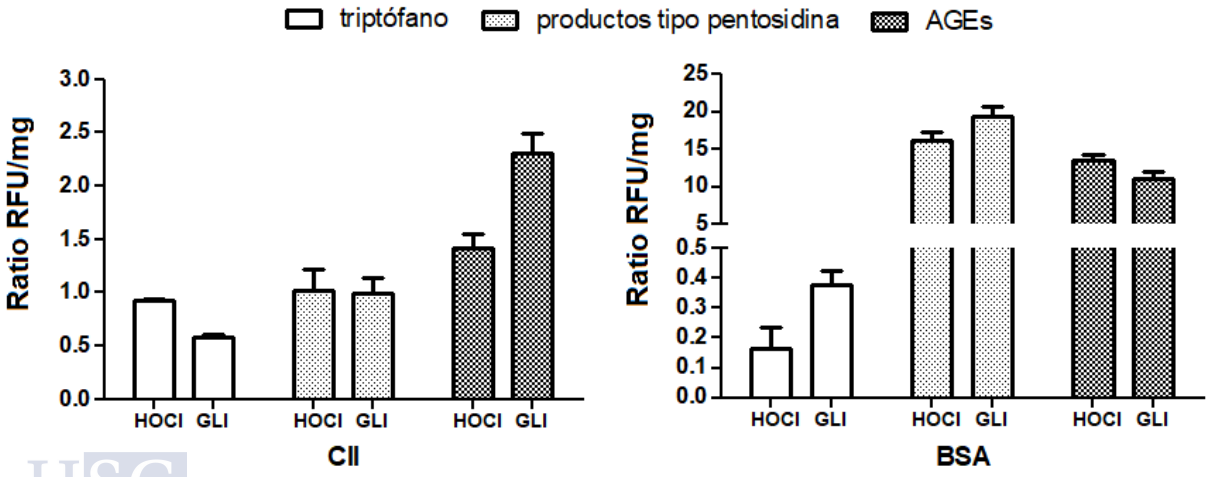


Figura 19. Relación entre la intensidad de fluorescencia del CII y la BSA carbonilados y las proteínas control. Las barras representan la media y el error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes. Las longitudes de onda de excitación específicas utilizadas fueron: triptófano, 295nm; productos de tipo pentosidina (PTP), 335nm y AGEs, 370nm. Las reacciones de carbonilación se realizaron con HOCl o con ribosa (GLI).

Finalmente, el ensayo con DNPH permitió cuantificar la presencia de grupos carbonilo en las proteínas modificadas. El contenido de carbonilos del CII nativo fue de 12.6 nmol/mg proteína. Tras su modificación, este contenido se incrementó hasta 40.5 nmol/mg para el HOCl-CII y 121.6 nmol/mg para el GLI-CII. Por su parte, el nivel de grupos carbonilo en la BSA nativa fue bastante inferior al del CII, 3.0 nmol/mg, aumentando considerablemente hasta 21.1 nmol/mg y 35.6 nmol/mg al modificarse con HOCl y ribosa respectivamente. Aunque la cantidad absoluta de grupos carbonilo (en nmol/mg) medidos en el CII modificado eran mayores que en la BSA modificada, es la BSA la que mostró un mayor aumento respecto de su estado nativo (Figura 20). El alto contenido de grupos carbonilos observado en el CII nativo podría explicarse por la presencia de entrecruzamientos intramoleculares [329], de grupos amino glicosilados [330] y de PTP que contienen carbonilos y que están ausentes en la BSA.

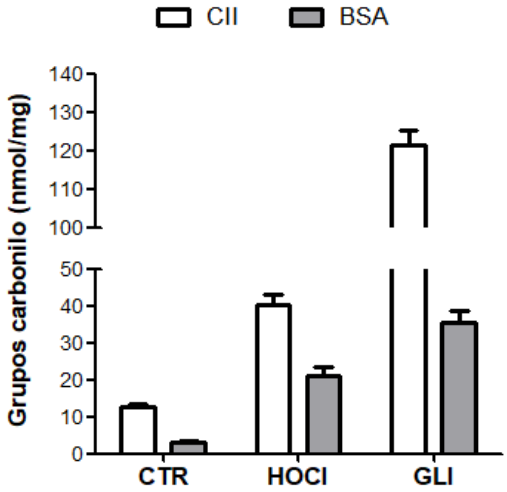


Figura 20. Concentración de grupos carbonilo en el CII y la BSA modificados con HOCl y ribosa y control. Las barras representan la media y el SEM de al menos 4 experimentos independientes.

4.2. VERIFICACIÓN DE LA NITRACIÓN

La presencia de 3-NT en las PS nitradas se verificó mediante tres técnicas complementarias: espectrofotometría, ELISA y análisis de fluorescencia. El ensayo espectrofotométrico del estándar comercial mostró un pico ancho de máxima absorción a 420 nm. El espectro del FBS nitrado y de las PS nitradas también mostró un pico a 420 nm aunque éste no estaba tan definido como el del estándar 3-NT, probablemente en relación con la mayor complejidad de estas muestras. El FBS se modificó con varias concentraciones de agente nitrante (5, 10, 20 and 40 mM $NaONO_2$) y posteriormente se cuantificaron los niveles de 3-NT interpolando en la recta patrón construida con el estándar comercial 3-NT. Los niveles de 3-NT en el FBS nitrado aumentaron al emplear 10 mM en vez de 5 mM de $NaONO_2$ (13 ug 3-NT/mg *vs.* 5 ug 3-NT/mg, respectivamente). En cambio, concentraciones mayores de $NaONO_2$ no resultaron en una mayor formación de 3-NT, lo que indica que con una concentración de 10 mM la nitración del FBS es óptima. Los niveles de 3-NT en el CTR-FBS fueron de 1 ug 3-NT/mg, considerablemente menores que en las muestras nitradas. Por lo tanto se utilizó esta concentración de $NaONO_2$ para modificar las PS resultando en una concentración de 17.0 ug

3-NT/mg en comparación con los 5.5 ug 3-NT/mg de las PS sin tratar. La cuantificación realizada con el ELISA comercial que es más específico de la modificación mostró una mayor diferencia entre las PS tratadas y sin tratar, con un nivel de 3-NT en las PS nitradas de 22.0 ug 3-NT/mg y de 1.9 ug 3-NT/mg en las PS sin nitrar.

El análisis de fluorescencia realizado proporcionó información complementaria sobre el proceso de nitración ya que refleja la presencia de tirosinas no modificadas (Figura 21). La intensidad de fluorescencia emitida por el FBS no modificado fue considerablemente superior a la registrada para el 3-NT-FBS, cuya emisión de fluorescencia fue similar a la del blanco. Esta completa disminución de la intensidad de fluorescencia indica que la mayoría de las tirosinas del FBS se han nitrado. Por el contrario, la nitración de las PS no produjo una disminución tan completa de la señal fluorescente correspondiente a la tirosina (Figura 21B). La presencia de este pico de emisión en las PS nitradas indica que una fracción significativa de las tirosinas no se modificó, probablemente porque se encuentran en un entorno químico no favorable.

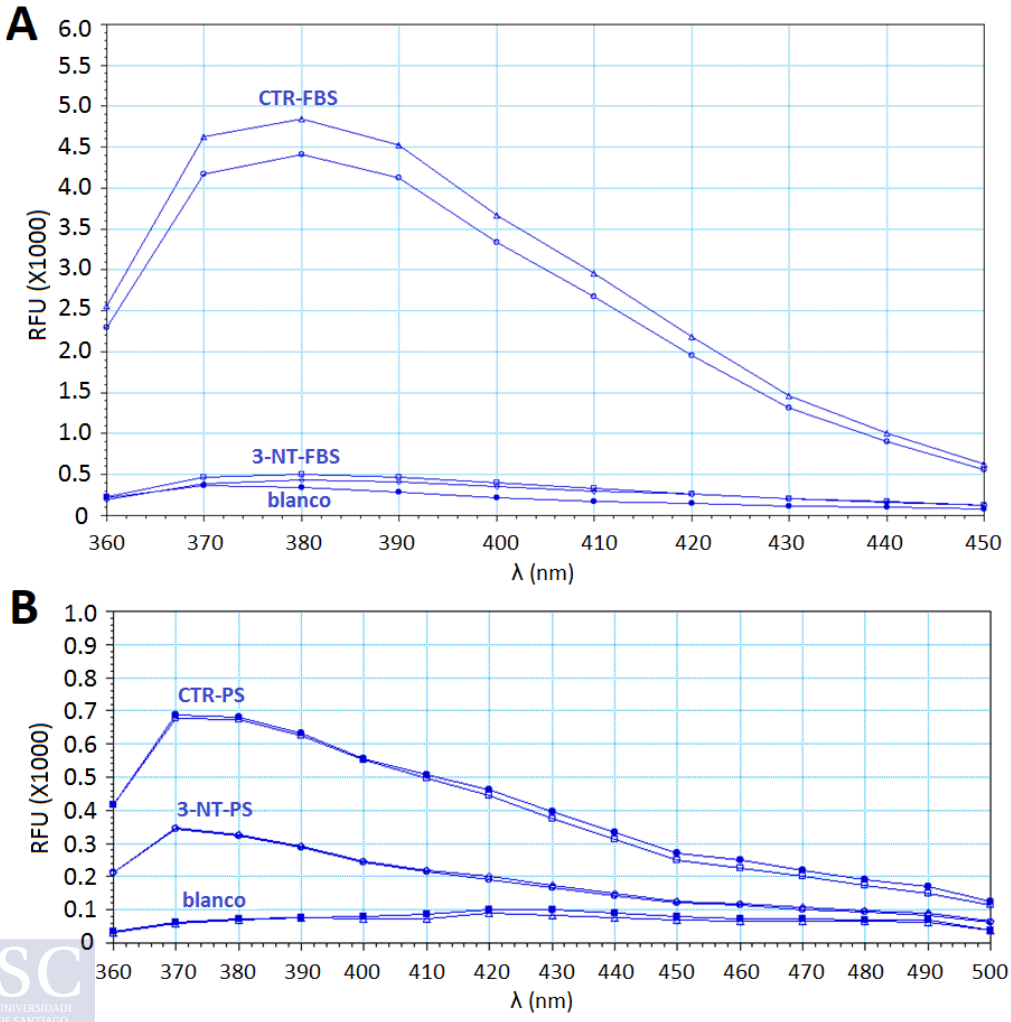


Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia específica de la tirosina de las muestras de FBS y de PS nitradas y nativas. El gráfico A muestra los espectros de emisión superpuestos del 3-NT-FBS, el CTR-FBS y el blanco. El gráfico B muestra los espectros de emisión superpuestos de las 3-NT-PS, el CTR-PS y el blanco. Se muestra un espectro representativo de cada muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3. VERIFICACIÓN DE LA HOMOCISTEINILACIÓN

La cantidad de Hci incorporada a la HSA o a las proteínas sinoviales (PS) se evaluó por cuantificación de la S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Las muestras control de HSA y PS estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo. Las proteínas se incubaron con 0.4, 1.0 y 10 mM de L-Hci-tiolactona durante 16 h y con 0.4 mM L-Hci-tiolactona por 32 h. Ninguna condición fue mejor que la de 0.4 mM por 16 h para la HSA que incorporó 0.81 nmol Hci/mg sin degradación significativa. Sin embargo, las PS mostraron el máximo sin degradación al incubar con L-Hci-tiolactona a 1 mM dando lugar a 2.26 nmol Hci/mg. Esta preparación de PS fue la seleccionada como antígeno para los ELISA.

4.4. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CII CARBONILADO EN PACIENTES CON AR TEMPRANA

Para el estudio de anticuerpos frente a especies carboniladas de CII (anti-CII carbonilado) se seleccionaron 182 pacientes con AR temprana y 164 controles del Hospital Clínico Universitario de Santiago. La inclusión únicamente de pacientes con AR temprana se debe a que los anticuerpos se describieron por primera vez en este tipo de pacientes [37]. Además se comprobó que las características de las dos colecciones de pacientes eran bastante similares (Tabla 33).

Tabla 33. Características clínicas de los pacientes con AR temprana incluidos en el estudio de los anticuerpos anti-CII carbonilado. El tiempo de evolución y la edad de diagnóstico se representan como la mediana y el IQR. El resto de variables se representan como porcentaje (%). El valor de P se muestra para la comparación entre las dos colecciones de pacientes. Dato disponible para < 98% de los pacientes del estudio actual: FAME previo 73%, erosiones 68.7%, FR 91.8% y anti-CarP 85.2%. El valor de *P* se muestra para la comparación entre las dos colecciones. na = no aplicable

Características clínicas	**Estudio actual (n = 182)**	**Strollo *y col.* (n = 85)**	***P***
Edad, años	58 (48 – 71)	51 (22 – 70)	na
Tiempo de evolución, años	0 (0 – 1)	<1	na
Sin FAME previo	109 (82)	85 (100)	$3.3x10^{-5}$
Mujeres	112 (62)	61 (72)	0.1
Fumadores	54 (30)	-	-
Erosiones	17 (14)	-	-
Anti-CCP, positivo	119 (65)	49 (58)	0.5
FR, positivo	94 (56)	-	-
Anti-CarP, positivo	63 (41)	-	-

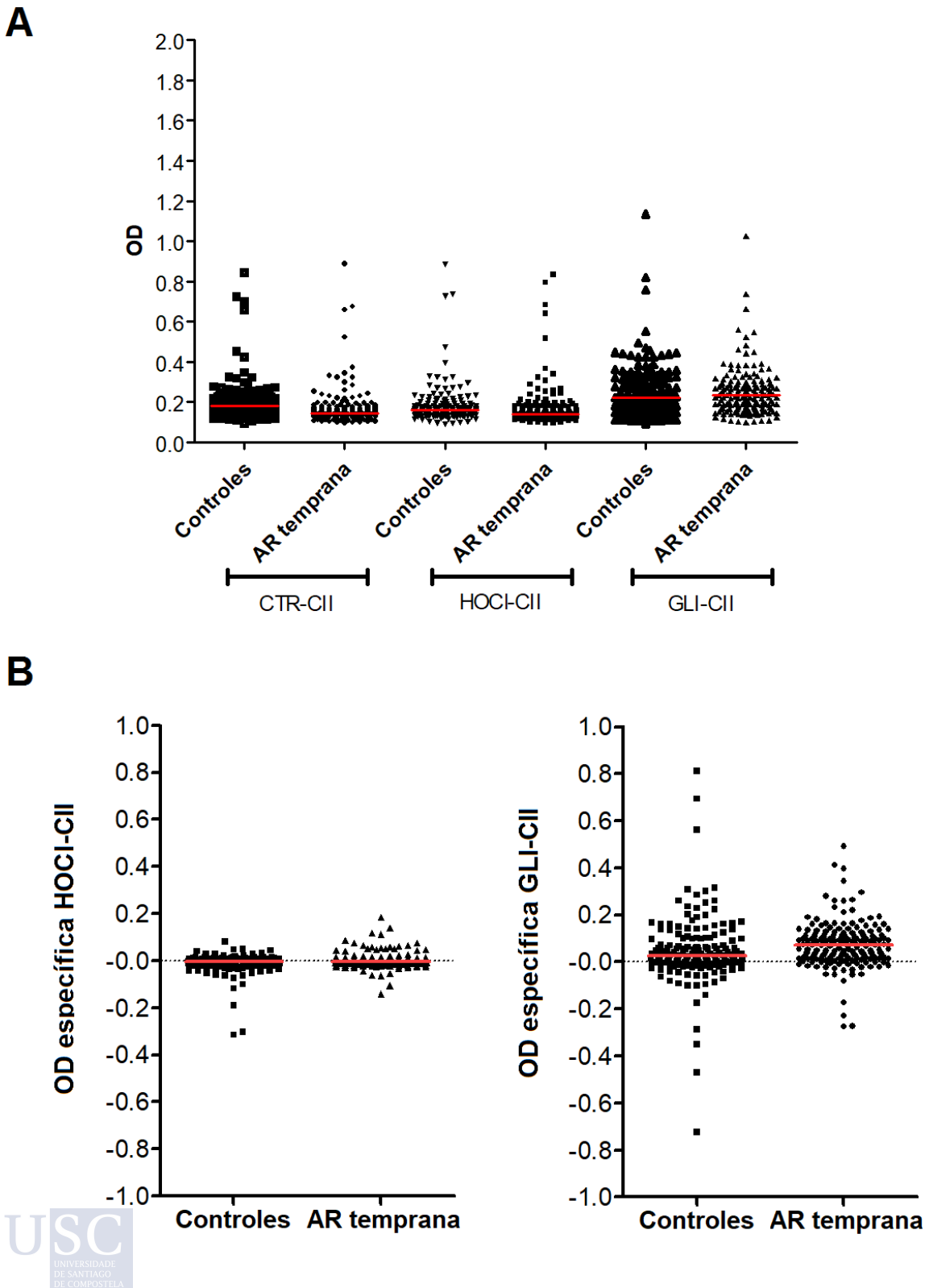
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Como ya se ha descrito, se buscaron anticuerpos frente a CII carbonilado con HOCl (anti-HOCl-CII) o con ribosa (anti-GLI-CII) y se compararon con la inmunorreactividad frente a CII sin modificar (anti-CTR-CII) (Figura 22 y Tabla 34). Los resultados mostraron una frecuente reactividad frente al CII sin modificar que fue similar a la observada frente a HOCl-CII tanto en los controles como en los pacientes con AR y solo ligeramente inferior a la observada frente a GLI-CII. Además, la reactividad anti-CTR-CII fue significativamente mayor en los controles que en los pacientes. Estas características de la reactividad frente a CTR-CII afecta a la interpretación de las señales obtenidas frente a las dos formas carboniladas de CII. Por una parte, la reactividad frente a HOCl-CII fue un mero reflejo de la reactividad frente al CII sin modificar en la gran mayoría de las muestras estudiadas como se evidenció tras restar los valores frente a CTR-CII para obtener la señal específica. En cuanto a la reactividad frente a GLI-CII, se observó una cierta reactividad específica tras restar la reactividad frente a CTR-CII. Esta reactividad específica anti-GLI-CII fue significativamente mayor en los pacientes con AR que en los controles. Sin embargo, esta diferencia debe tomarse con mucha cautela por la pequeña magnitud de la señal y porque la reactividad frente a anti-GLI-CII sin corrección no fue diferente en pacientes y controles. Estos resultados contrastan considerablemente con los descritos por Strollo *y col.* [37]: 92.9% pacientes positivos para los anticuerpos anti-HOCl-CII y 64.7% para los anticuerpos anti-GLI-CII.

Tabla 34. Niveles de anticuerpos anti-CII carbonilado en pacientes con AR temprana y controles sanos. La reactividad se determinó empleando como antígeno HOCl-CII o GLI-CII y se expresa como la mediana de la señal en OD y el IQR. La corrección de la reactividad se realizó restando a la reactividad del antígeno modificado la reactividad del antígeno nativo CTR-CII. El valor de *P* se muestra para la comparación entre los controles sanos y los pacientes con AR temprana.

		Controles		**AR temprana**		
Antígeno	**Corrección**	**OD mediana**	**IQR**	**OD mediana**	**IQR**	***P***
CTR-CII	-	0.174	0.147 – 0.201	0.143	0.128 – 0.169	5.0×10^{-9}
HOCl-CII	no	0.160	0.142 – 0.187	0.141	0.127 – 0.173	3.1×10^{-5}
HOCl-CII	sí	-0.004	-0.020 – 0.005	-0.003	-0.011 – 0.008	0.01
GLI-CII	no	0.221	0.163 – 0.305	0.234	0.171 – 0.285	0.5
GLI-CII	sí	0.027	-0.010 – 0.099	0.072	0.016 – 0.115	3.1×10^{-4}

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 22. Reactividad frente a CII carbonilado en pacientes con AR temprana y controles. La reactividad se determinó como se indica en la Tabla 34. El gráfico A muestra la reactividad medida como OD antes de corregir y el gráfico B muestra la reactividad específica después de corregir por la reactividad basal frente a CTR-CII. La línea roja representa la mediana del valor OD en cada grupo.

4.5. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS/PÉPTIDOS NITRADOS EN PACIENTES CON AR ESTABLECIDA

Para el estudio de los anticuerpos anti-proteínas/péptidos nitrados (anti-Nitra) del isotipo IgG que reconocen la 3-NT se seleccionaron 57 controles sanos y 143 pacientes con AR establecida del Hospital Clínico Universitario de Santiago cuyas características se recogen en la Tabla 35. La mayoría de los pacientes eran mujeres, presentaban erosiones y eran seropositivos para los autoanticuerpos anti-CCP o FR. La prevalencia de fumadores fue baja, rasgo característico de los pacientes con AR de Santiago.

Tabla 35. Características clínicas de los 143 pacientes con AR establecida seleccionados para estudiar los anticuerpos anti-proteínas/péptidos nitrados y anti-proteínas homocisteiniladas. Las variables de edad de diagnóstico y tiempo de evolución se representan como la mediana y el IQR mientras que el resto de variables se representan como porcentaje (%). Dato disponible para <98% de los pacientes: fumadores 90.9% y FR 96.5%.

Caracteristicas clínicas	AR
Edad, años	61 (50 – 72)
Tiempo de evolución de la enfermedad, años	11 (5 – 21)
Mujeres	112 (78)
Fumadores	23 (18)
Erosiones	92 (66)
Portador EC	87 (61)
Anti-CCP positivo	97 (68)
FR positivo	84 (61)
Anti-CarP, positivo	48 (34)

La reactividad frente a las PS nitradas (3-NT-PS) fue escasa, (Figura 23A y Tabla 36). Más en detalle, los niveles de anticuerpos frente a 3-NT-PS detectados en los pacientes con AR no fueron significativamente diferentes de los niveles detectados en los controles (Tabla 36). Además, la corrección por la señal frente al antígeno nativo (CTR-PS) resultó su práctica anulación (Figura 23B). En vista de estos resultados, se completó el estudio con el análisis de la reactividad frente a péptidos nitrados sintéticos (3-NT-pep). Los resultados mostraron algo de reactividad que fue más elevada en los pacientes que en los controles, tanto frente a los péptidos nitrados como frente a los péptidos control (Figura 23 y Tabla 36). La diferencia de reactividad frente a 3-NT-pep desapareció después de corregir por la señal frente a CTR-pep (Tabla 36). Por lo tanto, tampoco se observó reactividad específica frente a la nitración en el suero de los pacientes AR, replicando los hallazgos obtenidos con las PS nitradas.

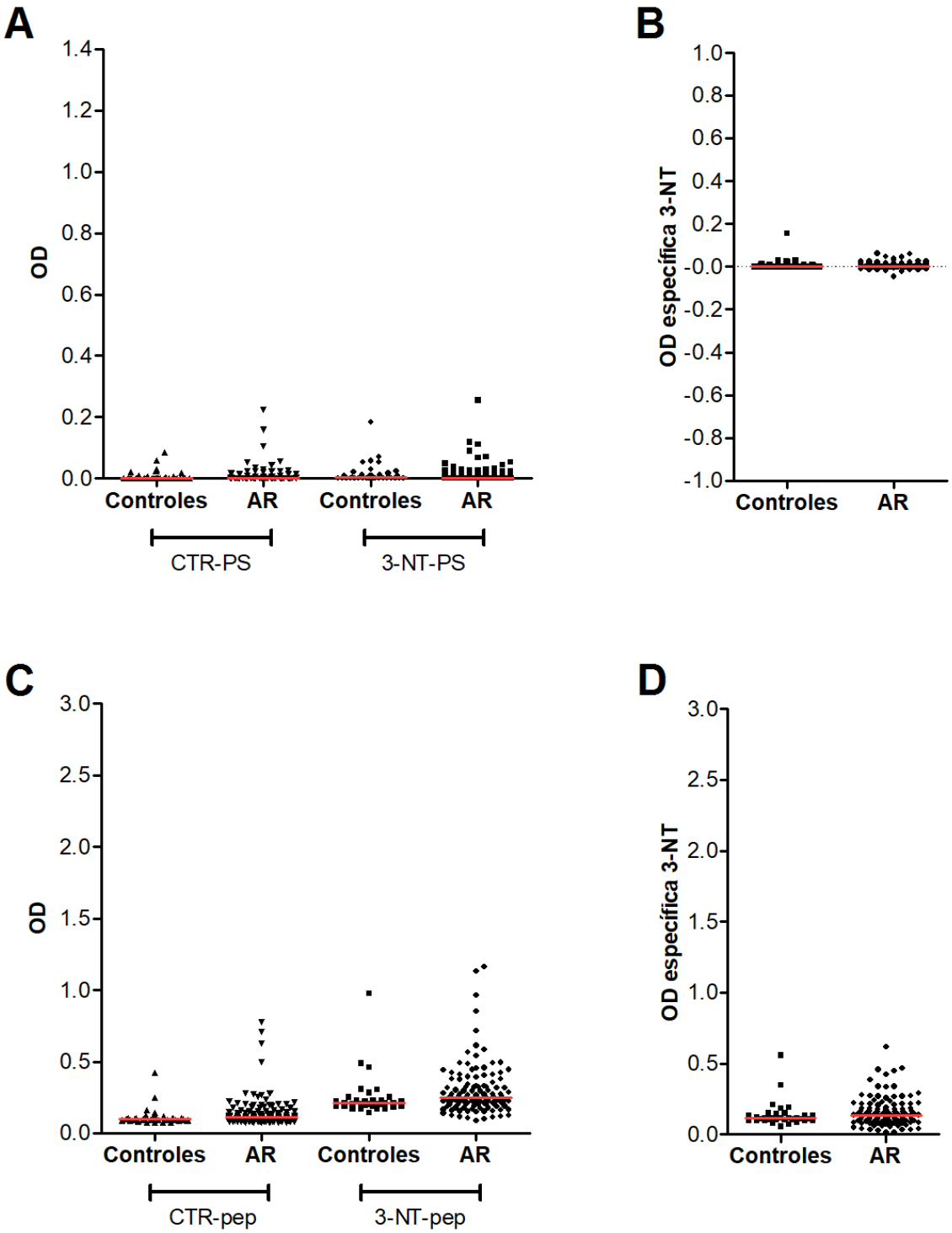


Figura 23. Reactividad frente a proteínas y péptidos nitrados en pacientes con AR y controles sanos incluidos en el presente estudio empleando 3-NT-PS o 3-NT-pep como antígenos. Los gráficos A y B muestran la reactividad medida como OD empleando como antígeno PS nitradas *in vitro* mientras que los gráficos C y D muestran la reactividad empleando como antígeno una mezcla de péptidos sintéticos nitrados. Los gráficos A y C muestran la reactividad antes de corregir por la reactividad basal de los correspondientes antígenos nativos. Los gráficos B y D muestran la reactividad específica después de corregir por la reactividad basal correspondiente. La línea roja representa la mediana del valor OD en cada grupo.

Tabla 36. Niveles de anticuerpos anti-Nitra en pacientes con AR establecida y controles sanos. La reactividad de los anticuerpos anti-Nitra se determinó empleando como antígeno 3-NT-PS o una mezcla de péptidos sintéticos nitrados (3-NT-pep) y se expresa como la mediana de la OD y el IQR. La corrección de la reactividad se realizó restando a la reactividad del antígeno nitrado la reactividad del antígeno nativo correspondiente. El valor de *P* se muestra para la comparación entre los controles sanos y los pacientes con AR.

		Controles		AR		
Antígeno	**Corrección**	**OD mediana**	**IQR**	**OD mediana**	**IQR**	***P***
CTR-PS	-	0.020	0.008 – 0.026	0.022	0.009 – 0.033	0.1
3-NT-PS	no	0.011	0.008 – 0.035	0.018	0.009 – 0.028	0.1
3-NT-PS	sí	0.009	0.008 – 0.021	0.008	0.001 – 0.018	0.03
CTR-pep	no	0.097	0.090 – 0.106	0.111	0.089 – 0.150	0.02
3-NT-pep	no	0.209	0.190 – 0.230	0.250	0.201 – 0.329	0.02
3-NT-pep	sí	0.113	0.100 – 0.133	0.137	0.097 – 0.185	0.1

4.6. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS HOMOCISTEINILADAS EN PACIENTES CON AR ESTABLECIDA

Para el estudio de los anticuerpos anti-proteínas homocisteiniladas (anti-Hci) del isotipo IgG se emplearon los mismos controles sanos y pacientes con AR del estudio de los anticuerpos anti-Nitra (Tabla 35).

Se analizó la reactividad frente a las PS homocisteiniladas (Hci-PS) y nativas (CTR-PS) en el suero de los pacientes con AR y de los controles. Los niveles de los anticuerpos fueron superiores en los pacientes en comparación con los controles tanto frente al antígeno modificado como frente al nativo (Figura 24A y Tabla 37), por lo que es imprescindible considerar los dos anticuerpos de forma conjunta. Otra característica notable es que la reactividad frente a CTR-PS fue mayor que frente a Hci-PS, tanto en los controles como en los pacientes, indicando que la reactividad detectada no es específica de la homocisteinilación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

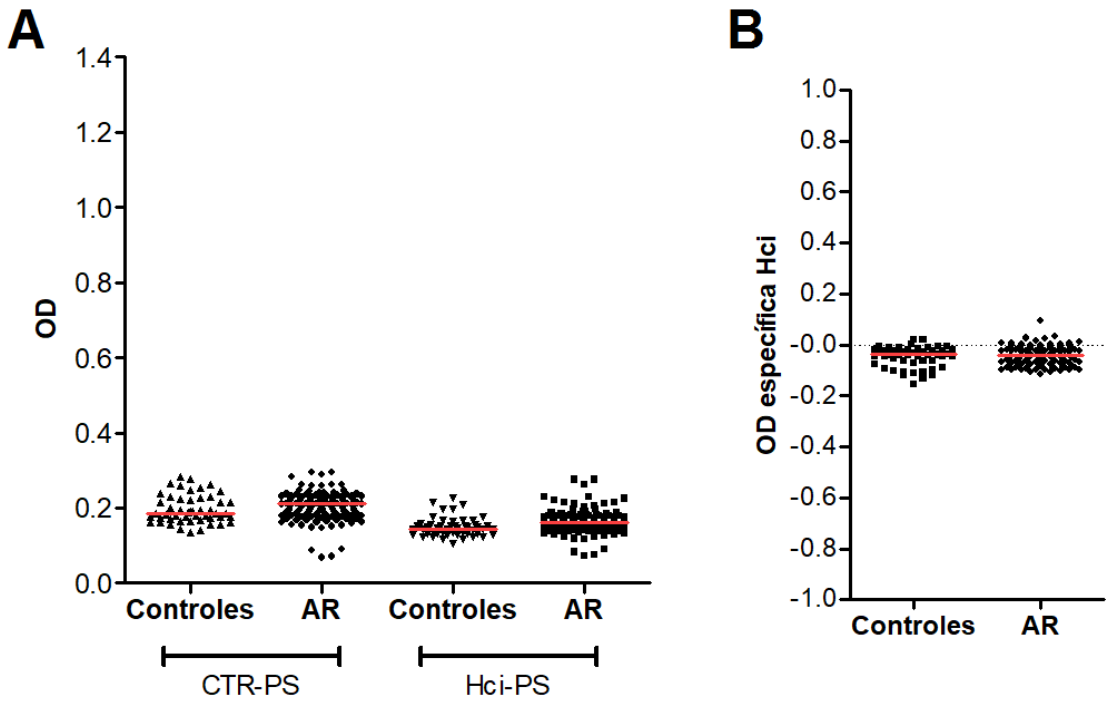


Figura 24. Reactividad frente a PS homocisteiniladas en pacientes con AR y controles sanos. El gráfico A muestra la reactividad medida como OD antes de corregir por la reactividad frente a CTR-PS y el gráfico B muestra la reactividad específica después de la corrección. La línea roja representa la mediana del valor OD en cada grupo.

Tabla 37. Niveles de anticuerpos anti-Hci-PS en pacientes con AR establecida y controles sanos. La reactividad de los anticuerpos anti-Hci-PS se expresa como la mediana de la OD y el IQR. La corrección de la reactividad se realizó restando a la reactividad del antígeno modificado la reactividad del antígeno nativo. El valor de *P* se muestra para la comparación entre los controles sanos y los pacientes con AR.

		Controles		AR		
Antígeno	**Corrección**	**OD mediana**	**IQR**	**OD mediana**	**IQR**	***P***
CTR-PS	-	0.186	0.171 – 0.221	0.211	0.181 – 0.229	0.04
Hci-PS	no	0.145	0.130 – 0.155	0.160	0.145 – 0.178	1.1×10^{-4}
Hci-PS	sí	-0.038	-0.069 – -0.020	-0.041	-0.074 – -0.015	0.5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.7. RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CII CARBONILADO CON EL TRATAMIENTO

Finalmente, hemos analizado si el tratamiento previo con FAME de los pacientes con AR temprana ha tenido una influencia sobre los niveles de anticuerpos anti-Carbo dado que la alta sensibilidad de estos anticuerpos se ha descrito en pacientes con AR temprana que no estaban tratados con FAME. La reactividad frente a HOCl-CII estuvo significativamente aumentada en los pacientes sin tratamiento con FAME (OD mediana [IQR] = 0.141 [0.129-0.169] *vs.* 0.137 [0.121-0.178]; *P* = 0.02, pacientes no tratados con FAME *vs.* tratados). Sin embargo, después de corregir por la reactividad frente a CTR-CII la situación fue la inversa, observándose una reactividad más alta en los pacientes tratados (OD mediana [IQR] = -0.005 [-0.014–0.004] *vs.* 0.004 [-0.005–0.012]; *P* = 0.004, pacientes no tratados con FAME *vs.* tratados). Contrariamente, no se observaron diferencias en la reactividad frente a GLI-CII antes y después de corregir entre los pacientes tratados con FAME y los no tratados (OD anti-GLI-CII sin corregir: mediana [IQR] = 0.245 [0.191-0.288] *vs.* 0.223 [0.160-0.274]; *P* = 0.2; OD anti-GLI-CII corregida: mediana [IQR] = 0.086 [0.026-0.123] *vs.* 0.073 [0.031-0.133]; *P* = 1.0, no tratados con FAME *vs.* tratados en todas las comparaciones).

Adicionalmente, hemos comparado la reactividad frente al CII carbonilado entre los pacientes sin tratamiento con FAME y los controles sanos. Este análisis mostró que la reactividad frente a HOCl-CII fue significativamente más alta en los controles que en los pacientes no tratados (OD anti-HOCl-CII sin corregir: mediana [IQR] = 0.160 [0.142-0.187] *vs.* 0.141 [0.129-0.169]; *P* = $3.2x10^{-4}$, controles *vs.* pacientes no tratados con FAME), replicando los resultados obtenidos en todos los pacientes con AR temprana (Tabla 34). Sin embargo, esta diferencia desapareció después de corregir por la reactividad frente a CTR-CII (*P* = 1.0). En cambio, la reactividad frente a GLI-CII fue significativamente mayor en los pacientes no tratados con FAME en comparación con los controles sanos al considerar tanto los valores sin corregir como los corregidos (OD anti-GLI-CII sin corregir: mediana [IQR] = 0.221 [0.163-0.305] *vs.* 0.245 [0.191-0.288]; *P* = 0.02; OD anti-GLI-CII corregida: mediana [IQR] = 0.027 [-0.010–0.099] *vs.* 0.086 [0.026-0.123]; *P* = $2.4x10^{-5}$, controles sanos *vs.* no tratados con FAME en todas las comparaciones). De nuevo, este resultado replica los hallazgos obtenidos en todos los pacientes con AR temprana e indica que la falta de diferencias en la reactividad frente a GLI-CII detectada entre los controles sanos y el conjunto de pacientes con AR temprana (Tabla 34) es atribuible, al menos en parte, a la menor reactividad mostrada por los pacientes tratados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se discutirán a continuación. El estudio de los anticuerpos anti-cH4/39-40 en pacientes con AR ha revelado que el péptido de la histona H4 es la reactividad predominante dentro del repertorio de los ACPA detectados con el ensayo de anti-CCP2, aunque el nivel de solapamiento no fue suficiente como para considerarlos ensayos equivalentes. Además, los anticuerpos anti-cH4/39-40 se asociaron de forma significativa con las erosiones independientemente de los anti-CCP y con el alelo de riesgo *PTPN22*. Estas asociaciones indican que los anticuerpos anti-cH4/39-40 podrían distinguir un subgrupo de pacientes con un fenotipo diferenciado y permiten relacionarlos con la patogenia de la AR, aunque es necesario identificar los mecanismos que expliquen cómo el alelo de riesgo *PTPN22* predispone al desarrollo de ACPA frente a la histona H4 y cómo los anticuerpos anti-cH4/39-40 participan en la pérdida ósea. En cuanto al estudio de nuevos anticuerpos frente a modificaciones postraduccionales, los anticuerpos anti-AcOrn se han identificado como los anticuerpos que mejoran de forma significativa la clasificación de los pacientes con EA como AR cuando se consideran en concordancia con los anticuerpos anti-CCP y FR respecto de los criterios ACR/EULAR 2010 y de la presencia concordante de otros anticuerpos. Estos hallazgos refuerzan la idea de utilizar la concordancia de anticuerpos para mejorar los criterios actuales de clasificación y presentan a los anticuerpos anti-AcOrn como un nuevo biomarcador de utilidad clínica. También se han evaluado los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA que no mostraron una sensibilidad elevada en los pacientes con AR en comparación con otros autoanticuerpos específicos de la AR, descartando su potencial utilidad como biomarcadores de clasificación. Los anticuerpos anti-MAA mostraron independencia de los anti-MDA, como indicaron la falta de correlación entre sus niveles y la concordancia en estado similar a la observada con otros anticuerpos de la AR. Este resultado permite diferenciar a los anticuerpos anti-MAA de los anti-MDA y contribuye a definir con más precisión la respuesta inmune observada en los pacientes con AR. Finalmente, se ha estudiado la presencia de anticuerpos anti-Carbo, anti-Nitra y anti-Hci en pacientes con AR, pero no se ha observado reactividad específica frente a las modificaciones postraduccionales, sino reactividad inespecífica frente a los antígenos no modificados. Este resultado indica que los anticuerpos anti-Carbo, anti-Nitra y anti-Hci no son relevantes en la AR al mismo tiempo que desaconseja el uso del término general AMPA para referirse al repertorio de anticuerpos detectados en pacientes con AR. Por el momento, de los anticuerpos que reconocen modificaciones postraduccionales, sólo los ACPA, los anticuerpos anti-CarP y en menor medida los AAPA han relacionado con la AR de forma consistente y fiable.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. LOS ANTICUERPOS ANTI-cH4/39-40 MUESTRAN ELEVADA CONCORDANCIA CON EL ENSAYO DE ANTI-CCP2 PERO NO SUFICIENTE COMO PARA EXPLICARLO O REEMPLAZARLO

En este apartado del trabajo se ha observado que los anticuerpos que reconocen el péptido citrulinado immunodominante de la histona H4 identificado por Meng *y col.* [217] estaban presentes en cerca de la mitad de nuestros pacientes con AR y en el 73% de los pacientes con AR anti-CCP positivos. Además, mostraron la mayor concordancia y correlación en títulos con los anticuerpos anti-CCP entre los 6 péptidos citrulinados analizados. Como los otros 5 péptidos incluyen algunos de los más relevantes en la autoinmunidad evidenciada con el ensayo de anti-CCP, estos resultados confirman el protagonismo de la reactividad frente a cH4/39-40 aunque no alcanzando el nivel de potencial reemplazamiento descrito por Meng *y col.*. Por otra parte, los anticuerpos anti-cH4/39-40 mostraron una asociación con los factores de riesgo de AR diferenciada, ya que fueron los únicos anticuerpos asociados significativamente con el alelo de riesgo de *PTPN22* mientras que su relación con el EC y con el tabaquismo fue comparable con la de otros anticuerpos. También destacaron en su asociación con la presencia de erosiones, pues solo estuvieron por detrás de los anti-CCP. Estas características sitúan a los anticuerpos anti-cH4/39-40 como uno de los ACPA más interesantes tanto por su potencial importancia en la patogenia de la AR como en su capacidad de distinguir un subtipo de pacientes con fenotipo propio, al tiempo que cuestionan su solapamiento con los anti-CCP.

En efecto, la inmunodominancia de los anticuerpos anti-cH4/39-40 en nuestros pacientes con AR no fue tan marcada como describieron Meng *y col.*,ya que estos autores los encontraron en el suero del 95% de los pacientes con AR ACPA positivos de origen europeo-americano [217]. Este nivel de concordancia tan alto, junto con otras evidencias, fue interpretado como indicación de que el péptido cH4/39-40 podría tener un papel único en la patogenia de la AR. Esta hipótesis es plausible, pues en la AR hay un aumento de la NETosis y en este proceso se produce una hipercitrulinación de proteínas que afecta de forma notable a las histonas y la extrusión del contenido del núcleo con exposición de la cromatina y sus histonas asociadas al medio extracelular. Además, Meng *y col.* propusieron que el péptido cH4/39-40 podría utilizarse como péptido único representando la respuesta anti-CCP en estudios dirigidos a inducir tolerancia como terapia para la AR. Nuestros resultados no pueden considerarse como un apoyo incondicional de estas interpretaciones debido a la menor concordancia observada. Además, hay otra posibilidad que sugerían los resultados de Meng *y col.* y que también se debilita con nuestros resultados. Esa posibilidad, que los autores no comentaban, es que el péptido cH4/39-40 fuese reconocido por la mayoría de los ACPA no porque se trate de un péptido inmunodominante en la patogenia, sino porque sus características le permiten ser reconocido de forma indiscriminada por ACPA inducidos frente a otras proteínas citrulinadas. Esto es lo que parece que hace el péptido de la vimentina mutada citrulinada (MCV). Este péptido (que incluye una arginina/citrulina extra respecto a la secuencia de la vimentina) es reconocido por la gran mayoría de los anticuerpos anti-CCP como hemos observado nosotros (Montes A. *y col*. no publicado) y otros autores [225,331]. Pero parece que esta propiedad es debida a la estructura del péptido y no a que sea el inductor de la mayoría de los ACPA. De hecho, el armazón del péptido MCV ha sido utilizado como base sobre la que estudiar otras modificaciones posttraducionales con gran sensibilidad [44,235]. Por ello se puede considerar que el péptido MCV se comporta como un mimotopo de muchos

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ACPA. Esta característica se entiende mejor al considerar que el repertorio ACPA de los pacientes con AR incluye un componente significativo de reactividad dirigida frente al residuo de citrulina independientemente de los aminoácidos que la rodean [332,333]. Esta característica se muestra de forma más clara al estudiar anticuerpos monoclonales y observar que reconocen un gran número de péptidos citrulinados. Por lo tanto, en todos los análisis de reactividad de los ACPA hay que tener en cuenta el componente compartido con otros antígenos y esto es lo que se ha hecho en este estudio mediante el análisis de la relación entre los anticuerpos anti-cH4/39-40 y otros ACPA y con las asociaciones condicionadas por la presencia de anti-CCP. De estos análisis se deduce que cH4/39-40 no es simplemente un mimotopo de los anti-CCP ya que los pacientes positivos muestran un patrón propio y asociaciones específicas.

No hay motivos para pensar que el origen del menor solapamiento entre anti-cH4/39-40 y anti-CCP que hemos observado se encuentre en los ELISA utilizados. Por una parte, el test para detectar anti-CCP fue de diferente generación en los dos estudios, anti-CCP2 en nuestro caso y anti-CCP3 en Meng *y col.* Las dos generaciones de ensayos anti-CCP muestran características muy similares en los estudios comparativos [334–336]. Las diferencias observadas siempre incluyen una mayor sensibilidad de los ELISA de tercera generación, por lo que si hubiéramos tenido los anticuerpos anti-CCP3 la disminución de concordancia con los anticuerpos anti-cH4/39-40 sería más notable que la observada. La otra diferencia entre los protocolos digna de mención afecta a la inmovilización de los péptidos a la placa que se realizó mediante la unión covalente del extremo carboxilo a los grupos amina de la placa en Meng *y col.*, mientras que nosotros inmovilizamos los péptidos biotinilados en su extremo carboxilo terminal sobre placas cubiertas con estreptavidina. Estos dos métodos forman parte de un grupo de protocolos que aseguran una unión suficiente de moléculas que como los péptidos no se adsorben bien al plástico de los pocillos. Además, estas técnicas aseguran una orientación determinada de las moléculas (que fue la misma en los dos estudios, con el extremo carboxilo hacia la placa) y aumentan la sensibilidad de detección en comparación con la simple adsorción [135,144,337,338]. El aumento de sensibilidad se atribuye a la mayor superficie del péptido expuesta resultado de la ausencia de áreas cubiertas por el plástico, la mejor retención de los péptidos durante los lavados, la distribución uniforme sobre la superficie y un aumento de la señal sobre el fondo. Sin embargo, la ausencia de estudios comparativos no permite saber si hay diferencias en la eficiencia de los distintos métodos de inmovilización. Otra posibilidad es que los resultados fueran muy sensibles al punto de corte utilizado ya que este puede cambiar de un estudio a otro. Sin embargo, utilizar el percentil 95 como punto de corte sólo clasificó 14 pacientes con AR adicionales como anti-cH4/39-40 positivos, de los cuales 12 fueron ACPA positivos, lo que supuso un aumento despreciable en el solapamiento con el subgrupo ACPA positivo (del 73% al 76%). También es necesario considerar si las características de los pacientes con AR incluidos en cada estudio podrían explicar las diferencias en solapamiento de los anticuerpos. Sin embargo, el componente genético es muy improbable que esté implicado pues el estudio de Meng *y col.* incluyó pacientes de dos grupos étnicos, nativos americanos y de origen europeo, que mostraron un grado similar de solapamiento entre los anticuerpos anti-cH4/39-40 y anti-CCP, 92 y 95%, respectivamente. Otras diferencias pueden estar en el componente ambiental o individual, pero solo una aparece en la poca información disponible sobre los pacientes estudiados por Meng *y col.*: hay un exceso de fumadores, con una frecuencia 3 o más veces superior. Esta diferencia puede ser relevante ya que el tabaco es el factor de riesgo ambiental más importante para la forma seropositiva de la AR sin que aumente el riesgo de la AR seronegativa [72,73]. El modelo

patogénico más aceptado que explicaría esta asociación específica con la AR seropositiva [83] propone que el tabaco induciría el aumento de la expresión de PAD en el pulmón promoviendo la citrulinación de proteínas que son reconocidas por el sistema inmune y, a través de la presentación antigénica en el contexto del EC, se desencadenaría la producción de ACPA y finalmente a la AR. Este modelo no sugiere ningún mecanismo por el cual el tabaco podría afectar a los distintos anticuerpos que son reconocidos con el ELISA anti-CCP, por lo que no dice nada sobre cómo la menor prevalencia de fumadores podría afectar al solapamiento de los anticuerpos. Sin embargo, no todas las evidencias apoyan este modelo patogénico, ni que el tabaquismo aumente de forma específica el riesgo de la AR ACPA positiva. Así, por ejemplo, se ha observado una falta de correlación entre la citrulinación de proteínas y la expresión de PAD en el pulmón con el tabaco [77,78,339] y una falta de asociación entre la producción de ACPA y la presencia de anomalías en el pulmón de los pacientes con AR fumadores [79–82]. A mayores, se ha descrito la asociación entre el tabaco y la presencia concordante de FR, ACPA y anticuerpos anti-CarP más que con la presencia únicamente de ACPA [47,76]. Por lo tanto, se ha propuesto un modelo alternativo que explicaría mejor las evidencias disponibles. Este modelo considera que el tabaco favorece la autoinmunidad también en otras enfermedades autoinmunes y la producción de autoanticuerpos frente a los varios autoantígenos de la AR. El aumento de riesgo no tendría especificidad por los ACPA sino preferencia por la presencia de múltiples autoanticuerpos posiblemente al favorecer la expansión de epítopos. Este modelo patogénico proporciona una posible explicación para el mayor solapamiento de la presencia de los autoanticuerpos en los fumadores. El solapamiento afectaría a todos los autoanticuerpos, no de forma específica a los anti-CCP y anti-cH4/39-40. Sin embargo, no se puede ir más allá en esta línea. Para hacerlo necesitaríamos tener información sobre la relación entre el tabaco y los anticuerpos en el estudio de Meng *y col.* Además, están en contra de esta hipótesis la ausencia de asociación significativa entre los anticuerpos y el tabaco en nuestros pacientes, y la similar prevalencia de pacientes anti-CCP positivos en los pacientes de origen europeo de los dos estudios (64 y 67%) a pesar de la notable menor presencia de fumadores en el nuestro. Finalmente, es necesario resaltar que ningún otro estudio ha analizado la reactividad frente a este péptido aunque la reactividad frente a la histona H4 citrulinada ha sido evaluada en otros trabajos que encontraron una prevalencia de anticuerpos en el rango intermedio entre lo observado en nuestro estudio y por Meng *y col.*, pero que no analizaron la relación entre la prevalencia de los anti-CCP y los anticuerpos anti-cH4. En más detalle, Pratesi *y col.* [221] describieron una sensibilidad de tan sólo el 13% en el suero de pacientes con AR empleando un péptido lineal sintético citrulinado en las posiciones 35, 36, 39, 40 y 45 (cH4/31-50), cifra que aumentó hasta un 63% utilizando ese mismo péptido en forma de cuatro péptidos idénticos sobre una estructura de lisinas con la tecnología MAP (*Multiple Antigenic Peptide*). Por su parte, Sohrabian *y col.* [216] identificaron un 61% de pacientes con AR positivos para el péptido cH4/31-50 empleado en el estudio anterior en formato array en vez de utilizarlo como antígeno individual en un ELISA estándar. Hemos utilizado la reactividad frente a los péptidos de otras proteínas citrulinadas como la vimentina, el fibrinógeno o la enolasa como referencia en el análisis de la relación de los anticuerpos anti-cH4/39-40 con los anti-CCP. Estos péptidos están bien caracterizados como antígenos en la AR y muestran un amplio rango de características [143,144,211,225,289,325]. Nuestros análisis mostraron que los anticuerpos anti-cH4/39-40 son los más próximos a los anti-CCP tanto en comparaciones dos a dos, como en las comparaciones incluyendo los 6 péptidos individuales. Estos resultados son muy notables, pues entre los péptidos con los que se ha comparado están los que muestran una mayor prevalencia de reactividades y algunas asociaciones más claras con factores de riesgo y características clínicas [290,291,317,340–342].

Además, no hay ningún otro estudio que haya realizado este tipo de comparación con los anticuerpos anti-cH4/39-40.

El análisis de los factores de riesgo mostró que los anticuerpos anti-cH4/39-40 estaban asociados con el EC y el alelo de riesgo de *PTPN22*, pero no con el tabaquismo que era muy poco prevalente. La asociación con el EC fue más débil que la observada con los anti-CCP y no se mantuvo en el análisis conjunto. Sin embargo, se debe destacar que la asociación con *PTPN22* fue significativa a pesar de que no hubo asociación significativa con los anti-CCP. Este hallazgo es novedoso no solo por la relativa independencia de los anti-CCP, sino porque es el primer trabajo en el que se detecta una asociación significativa entre el alelo de riesgo de *PTPN22* y un ACPA individual. Estudios previos habían descrito la asociación de una interacción entre la presencia de los alelos del EC del *HLA* y el alelo de riesgo *PTPN22* con una respuesta inmune dirigida frente a algunas especificidades finas citrulinadas en la enolasa [291,317,342] y la vimentina [340], pero no una asociación directa. Además, la validez de los análisis utilizados en esos estudios es dudosa, ya que se ha demostrado recientemente que el modelo de interacción que se había utilizado produce muchos falsos positivos [343], lo que refuerza la singularidad de la asociación encontrada aquí. Desafortunadamente, no hay otros estudios analizando la relación entre *PTPN22* y los anticuerpos anti-cH4/39-40, pero si se confirma será necesario investigar las causas de esta asociación particular. A priori, no parece posible aventurar una razón ya que el alelo de riesgo de PTPN22, 620W, se asocia con múltiples enfermedades autoinmunes que van desde las órgano-específicas como la tiroiditis autoinmune o la diabetes tipo 1 hasta las sistémicas como la AR o el lupus eritematoso sistémico [62], por lo que su efecto parece demasiado inespecífico como para afectar diferencialmente a un autoanticuerpo. De hecho, algunas de las enfermedades a las que predispone no se caracterizan por la producción de autoanticuerpos como la artritis psoriásica. Además, PTPN22 620W aumenta el riesgo tanto para la AR seropositiva como seronegativa, aunque de forma más débil en los últimos [46,60]. Esto se observó también en los pacientes analizados aquí, cuando se compararon con controles sanos. Tratar de argumentar a partir de los mecanismos moleculares y celulares es igualmente difícil. Los pacientes con AR presentan defectos en los puntos de control de la tolerancia a nivel central y periférico que impiden la eliminación de células B autorreactivas y permiten que éstas alcancen la periferia [67]. En individuos sanos portadores del alelo de riesgo *PTPN22* también se han observado defectos similares en los puntos de control de la tolerancia evidenciado por el aumento de células B autorreactivas en comparación con los individuos sanos sin el alelo de riesgo [344]. Se ha propuesto que esta incapacidad para eliminar las células B autorreactivas proviene de la alteración de la vía de señalización del receptor de células B (BCR) inducida por la proteína PTPN22 620W que provoca una disminución de la señal del BCR tras la estimulación con un antígeno endógeno evitando así su destrucción y favoreciendo que éstas células migren a la periferia y produzcan autoanticuerpos [68,69]. Sin embargo, no es posible ir más allá pues hay gran incertidumbre sobre los efectos del alelo de riesgo *PTPN22*, habiéndose descrito tanto aumento de función como pérdida de función de la fosfatasa PTPN22 [345]. Parece que las consecuencias dependerán del contexto en el que se estudian. Además, cada vez se descubren más efectos del alelo de riesgo de *PTPN22* y no se sabe cuáles son críticos para la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes en general o a la AR en particular. Así, además de los efectos mencionados sobre los linfocitos B, se han descrito alteraciones de la selección tímica de los linfocitos T y efectos sobre su activación cuando ya son maduros, posibles efectos sobre las células NK que son las que expresan los niveles más elevados de esta fosfatasa, sobre los monocitos, las células dendríticas y los neutrófilos [346]. En relación

con estas últimas células, un estudio realizado por Chang H H *y col.* [64] ha proporcionado evidencias de que la expresión de la variante PTPN22 620W induce un aumento en la NETosis además de un aumento de la citrulinación de proteínas. Las proteínas más abundantes en las NETs son las histonas [347] y son además los principales sustratos citrulinados tras la estimulación *in vitro* de neutrófilos [348] lo que podría estar relacionado con la asociación particular con los anticuerpos anti-cH4/39-40 encontrada aquí.

A pesar del elevado nivel de relación con los anticuerpos anti-CCP, los anticuerpos anti-cH4/39-40 mostraron una asociación independiente con la presencia de erosiones. Así, en el análisis condicionado por la presencia de anti-CCP, los pacientes con anticuerpos anti-cH4/39-40 tuvieron aproximadamente el doble de riesgo de presentar erosiones óseas que los pacientes negativos. Además, los anticuerpos anti-cH4/39-40 fueron los ACPA más frecuentemente detectados en los pacientes con erosiones. Este hallazgo es novedoso, pues no hay ningún estudio previo que hay analizado los anticuerpos anti- cH4/39-40 o anti-histonas citrulinadas en relación con las erosiones de la AR. Además, hay pocas evidencias de que alguno de los ACPA particulares tenga una asociación con las erosiones con independencia del conjunto de los anticuerpos anti-CCP. Quizás las evidencias más claras son las obtenidas con los anticuerpos frente a péptidos citrulinados de enolasa y vimentina [291,317,349], pero los resultados no son consistentes en todos los estudios [216,350–352]. Además, en el análisis actual la asociación de las erosiones con los anticuerpos frente a péptidos de estas proteínas son numéricamente menores que con los anticuerpos anti-cH4/39-40. Sin embargo, no es posible proponer con garantías un mecanismo que explique este resultado ya que no está claro cómo una reactividad ACPA individual podría contribuir a las erosiones. Lo que se sabe es que las erosiones son consecuencia de la destrucción ósea mediada por la acción de osteoclastos maduros activados que se forman a través de un proceso denominado osteoclastogénesis en el que los precursores de osteoclastos reciben señales estimuladoras e inician su diferenciación hacia osteoclastos funcionales [149]. Se ha propuesto que los ACPA son capaces de generar señales que estimulan la diferenciación de los precursores de osteoclastos a través de dos mecanismos, ambos englobados en lo que se conoce como osteoclastogénesis mediada por anticuerpos [353]. Un mecanismo implicaría el reconocimiento de la región Fc de los anticuerpos por los receptores FcγR expresados por los precursores de osteoclastos y sería común a todos los ACPA. Este mecanismo tiene un soporte experimental sólido. El otro mecanismo implica el reconocimiento por la región Fab de los anticuerpos de algún antígeno citrulinado expresado en la superficie de la membrana celular por los precursores de los osteoclastos y dependería de que el antígeno estuviera presente ahí. Sin embargo, el soporte experimental que se utilizó para proponer este segundo mecanismo se obtuvo con anticuerpos monoclonales que no reconocen proteínas citrulinadas según han reconocido los mismos autores, por lo que este mecanismo se debe considerar puramente hipotético por el momento [354]. Otros experimentos que podrían interpretarse como indicación de que algunos ACPA tienen un papel particular en la inducción de osteoclastogénesis son los de Harre U *y col.* [153]. Estos autores identificaron la vimentina citrulinada como la principal especificidad fina capaz de promover la osteoclastogénesis en experimentos empleando únicamente la región Fab de los ACPA, excluyendo así la región Fc. Los experimentos se realizaron con ACPA aislados de pacientes con AR seropositivos que mostraron afinidad por un péptido de la vimentina mutada citrulinada (MCV). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, la reactividad frente a ese péptido no puede considerarse como dirigida frente a la vimentina de forma específica, ya que actuaría como un mimetopo para una fracción importante de los ACPA. Por lo tanto, aunque la promoción de la osteoclastogénesis por los ACPA en experimentos con

ratones e *in vitro* explica la peor progresión radiológica y el aumento del daño óseo en los pacientes ACPA positivos no hay experimentos que permitan explicar un papel específico de una reactividad ACPA particular en el momento actual.

Las histonas citrulinadas han emergido como nuevos antígenos relacionados con la AR ampliamente reconocidos por los ACPA presentes en el suero de los pacientes. Su importancia se confirma en el presente estudio al observar que la reactividad frente al péptido cH4/39-40 fue la más parecida a la de los anti-CCP y superior a la detectada para otros péptidos citrulinados derivados de autoantígenos establecidos de la AR como el fibrinógeno, la vimentina y la enolasa. Por su parte, los análisis de regresión han revelado una asociación entre los anticuerpos anti-cH4/39-40 y la presencia del alelo de riesgo *PTPN22*, segundo factor de riesgo genético más importante de la AR, así como la presencia de erosiones de forma independiente de los anticuerpos anti-CCP. La primera asociación podría estar relacionada con procesos celulares alterados en la AR como la acumulación de células B autorreactivas en la periferia y un aumento de NETosis [67,355], principal fuente de histonas citrulinadas [347,348]. La segunda asociación podría revelar un papel específico de estos anticuerpos en la inducción de osteoclastogénesis, aunque todavía desconozcamos los mecanismos por los que puede producirse. En general, los hallazgos obtenidos en este estudio están en línea con resultados previos que sugieren que las histonas podrían tener un papel importante en la patogenia de la AR actuando como fuente de antígenos citrulinados. No obstante, un requisito necesario antes de concluir con más certeza es la replicación de estos resultados en muestras independientes, así como la realización de experimentos orientados a identificar los mecanismos que participan las asociaciones observadas y que permitan un conocimiento más preciso de la patogenia de la AR.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. VALOR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-AcOrn PARA MEJORAR LA CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EA

El estudio de los AAPA realizado en pacientes con EA ha identificado a los anticuerpos anti-AcOrn relacionados con la AR como los anticuerpos que mejoran la especificidad y la exactitud de la clasificación de la AR liberándola de la dependencia de los niveles de anticuerpos. La mejora significativa se obtuvo con uno de los dos enfoques explorados: el uso de un sistema de puntuación basado en la concordancia de anticuerpos. Con este enfoque, la concordancia de los anticuerpos anti-AcOrn con el FR y los anticuerpos anti-CCP fue superior a la observada con los anticuerpos anti-AcLys y anti-CarP. La especificidad y la exactitud mejoraron de forma significativa sobre las obtenidas con los criterios ACR/EULAR 2010, pero la mejora en la sensibilidad no alcanzó la significación. Estas mejoras deberían estimular estudios de replicación, así como la realización de más análisis. Únicamente después de la replicación de los resultados obtenidos y el consenso entre los expertos se podría concebir una recomendación para cambiar la clasificación de la AR. El otro enfoque explorado, dirigido a emplear los anticuerpos anti-AcOrn como biomarcadores en los pacientes seronegativos para los anticuerpos anti-CCP y FR, no produjo mejoras significativas.

Otros trabajos ya han señalado que los anticuerpos anti-AcOrn superan a varios otros AAPA como biomarcadores, aunque en ellos no se exploró la clasificación de la AR [44,130,178,179,235]. La combinación de los anticuerpos anti-AcOrn con los anti-AcLys no produjo mejoras significativas en la sensibilidad, probablemente debido a la elevada concordancia entre ellos. En este sentido, merece la pena mencionar que la sensibilidad de los AAPA en los pacientes con AR seronegativos fue mucho menor que la observada en dos informes previos [178,179]. Estos dos informes se encuentran disponibles sólo como resúmenes de congresos, circunstancia que limita la búsqueda de posibles causas de la discrepancia entre los resultados. En cambio, nuestros resultados están en línea con el 13.2% de pacientes anti-CCP negativos que fueron positivos para los anticuerpos anti-AcLys en el único artículo adicional que dispone de esta información [44].

La baja sensibilidad en los pacientes seronegativos para anti-CCP y FR indica que los AAPA no serán de utilidad para mejorar la clasificación de este subgrupo de pacientes [170,171,173–175]. Desafortunadamente, este parece ser el resultado común con los autoanticuerpos dada su presencia concordante en los pacientes con AR [44,176,177]. De hecho, la concordancia podría reflejar la existencia de vías de señalización subyacentes compartidas, como sugieren los trabajos recientes que indican que fumar predispone principalmente a la AR con múltiples autoanticuerpos [47,48,76].

Independientemente de sus causas, la concordancia de anticuerpos es una característica definitoria de los pacientes con AR [44,135,176,177,180,356–358], lo que podría aprovecharse para mejorar la clasificación de otra manera [181,182]. Ésta consistiría en aprovechar la mejor especificidad de la presencia concordante de dos o tres anticuerpos relativa a la que presenta cualquiera de ellos de forma aislada. Una observación que fue evidente en los 12 estudios recopilados en Verheul *y col.* [180]. En consecuencia, hemos propuesto un sistema de puntuación que otorga un mayor peso al componente serológico que el que se otorga en los criterios ACR/EULAR del 2010 (5 puntos para la máxima puntuación serológica de un total de 6 que se requieren para la clasificación como AR) [181]. Esta estrategia ha dado lugar a mejoras en la clasificación empleando los anti-CarP y que además se han replicado de forma independiente

en la cohorte de EA de Leiden [182]. En el trabajo actual se ha observado un patrón similar de concordancia con los anticuerpos anti-AcOrn en lugar de los anti-CarP. Los criterios de concordancia empleando los anticuerpos anti-AcOrn proporcionaron una especificidad y una exactitud mayores que los obtenidos con los criterios ARC/EULAR del 2010 y también superior a la que se obtuvo empleando la concordancia con los anti-CarP. Las mejoras sobre los criterios ACR/EULAR del 2010 obtenidas con las puntuaciones de la concordancia que incluyen a los anticuerpos anti-AcOrn fueron de una magnitud significativa (especificidad 5% y exactitud 4.2%). La relevancia de estas mejoras reside en que los criterios de clasificación son una herramienta para identificar grupos homogéneos de pacientes para la investigación [128,133,162,168]. Esta homogeneidad es necesaria para permitir la replicación, comparación y transferencia de los resultados de investigación. En consecuencia, se debe buscar la mayor especificidad posible para evitar la clasificación errónea y la inclusión de pacientes que no tienen la enfermedad. Además, si se tiene en consideración la idea generalizada de que la disminución en la especificidad de los criterios del 2010 en relación con los de 1987 (cuantificada en un 4% [169]) es un precio significativo que se ha pagado para obtener una clasificación de la AR más temprana y sensible [168,169], se facilita la comprensión de la importancia que tiene el aumento de especificidad obtenido en nuestros resultados sin pérdida alguna en la sensibilidad.

El hecho de que los mejores resultados se obtengan con independencia de los niveles de los anticuerpos es una ventaja que tiene la clasificación incluyendo los anticuerpos anti-AcOrn sobre la que incluye los anti-CarP. En este último caso, las puntuaciones de concordancia deben combinarse con las puntuaciones basadas en los niveles de FR y anticuerpos anti-CCP para alcanzar el mismo nivel de elevada especificidad y exactitud obtenido con los anticuerpos anti-AcOrn. Esta característica es una ventaja sobre otras estrategias que requieren los niveles de anticuerpos, entre las que se incluyen los criterios ACR/EULAR de 2010 y una modificación de esos criterios que se descarto después de evaluarla en tres cohortes de EA [183]. Un componente importante en esta estrategia alternativa era aumentar la especificidad de la clasificación al requerir niveles elevados de FR. Sin embargo, la asignación de niveles altos de FR fue menos reproducible que definir la positividad para FR. Además, esa estrategia mostró poca información añadida sobre la proporcionada con los anticuerpos anti-CCP [183]. Esto último fue en parte atribuible a la fuerte correlación entre los niveles altos de FR y la positividad para los anticuerpos anti-CCP. Por lo tanto, la independencia de los niveles de los anticuerpos, FR y anti-CCP, permitirá que la reproducibilidad de la clasificación de la AR basada en la concordancia con los anticuerpos anti-AcOrn sea mayor sin perder exactitud respecto a otras clasificaciones.

Otro aspecto que podría afectar a la reproducibilidad de los hallazgos es la existencia de diferencias entre los pacientes de distintas poblaciones. En este sentido, la frecuencia de fumadores en nuestros pacientes fue menor que en otras cohortes de pacientes con EA europeas [47,48,76]. Sin embargo, no hemos encontrado que el hábito tabáquico altere la asociación de la concordancia de anticuerpos con la clasificación de la AR. De hecho, la OR para la AR en los pacientes concordantes para 3 o 2 anticuerpos (FR, anti-CCP o anti-AcOrn) que han fumado en algún momento fue muy similar a la encontrada en el conjunto global de los pacientes (46.8 *vs.* 48.7 para la concordancia de 3 anticuerpos y 30.3 *vs.* 28.3 para la concordancia de 2 anticuerpos, respectivamente).

Es importante resaltar que nuestros resultados no implican que los anticuerpos anti-AcOrn estén involucrados en la patogénesis de la AR. Esta es una incógnita que debe resolverse con otro tipo de experimentos. También será necesario identificar el antígeno natural de estos anticuerpos porque la ornitina es un aminoácido no proteinogénico y el péptido empleado como antígeno en nuestro ensayo es además artificial en otros aspectos [44,235]. Por lo tanto, este campo podría encontrarse ahora en una situación similar a la experimentada con los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas [213,359]. Inicialmente se detectaron como anticuerpos que reconocían proteínas cutáneas, queratina o filagrina en la epidermis [360,361], antes de descubrir que su diana eran proteínas citrulinadas que están presentes en las articulaciones inflamadas como la vimentina, el fibrinógeno, la enolasa o las histonas [213,359]. En este sentido, es reconfortante que los primeros autoantígenos acetilados naturales reconocidos por los autoanticuerpos en pacientes con AR han sido identificados recientemente como histonas acetiladas que podrían tener un papel en la patogénesis de la AR a través de interacciones anticuerpos-NETosis [362]. Mientras se aclaran estas incógnitas, los anticuerpos anti-AcOrn pueden usarse como biomarcadores porque revelan una fracción del espectro de anticuerpos no revelados con los otros autoanticuerpos estudiados aquí. Esta afirmación se apoya en el análisis de regresión logística que incluye los anticuerpos FR, anti-CCP y anti-CarP además de los anticuerpos anti-AcOrn. Estos mismos análisis muestran que nuestros resultados no están cuestionados por los estudios recientes que demuestran varios niveles de reactividad cruzada entre los autoanticuerpos de la AR [332,363].

Una limitación de este estudio es la variación entre los dos lotes de ensayos empleados para determinar los AAPA lo que requirió la normalización de sus resultados y el restablecimiento del umbral de positividad. Desconocemos si éste ha sido un problema puntual o si ha sucedido con otros lotes de reactivos. Un argumento a favor de que fuera un problema puntual es que otros investigadores que han utilizado estos ensayos no han informado acerca de ninguna limitación técnica [44,130,178,179,235,364]. Cabe señalar que siempre se necesita precaución y controles adecuados con este tipo de ensayos para investigación que no están disponibles de forma comercial ni aprobados para uso clínico. Además de esta nota de cautela particular, es necesario que los hallazgos se repliquen en otras colecciones de muestras para tener confianza en los resultados. Esta prudencia es particularmente necesaria en relación con la afirmación de que los anticuerpos anti-AcOrn son más informativos que los anti-CarP porque las diferencias en los parámetros evaluados fueron pequeñas o no significativas. También es importante analizar en un futuro cohortes de pacientes con EA con “una o más articulaciones inflamadas” en lugar de “dos o más articulaciones inflamadas” que se utilizó como criterio para incluir a los pacientes con EA en nuestras cohortes. Otra limitación es el posible error introducido en la evaluación de las clasificaciones debido a la presencia del FR en los criterios de 1987 para la clasificación de la AR que han sido utilizados para determinar qué pacientes tenían AR a los 2 años de seguimiento. El peso del FR en esos criterios es menor que el que tiene en los criterios de 2010 [162], pero aun así, podría estar sesgando los resultados. Para evaluar esta posibilidad comparamos los parámetros de los anticuerpos anti-AcOrn evaluados en los pacientes anti-CCP negativos y en los FR negativos. La presencia de un sesgo significativo debido a la inclusión del FR en los criterios de 1987 debería dar como resultado un aumento de la sensibilidad en los pacientes anti-CCP negativos porque cierta fracción de ellos son FR positivos. Afortunadamente, se encontró el resultado opuesto: la sensibilidad para los pacientes con AR anti-CCP negativos fue de 8.4% y de 17.4% para los FR negativos. Finalmente, la implementación de los anticuerpos anti-AcOrn requerirá una prueba de laboratorio adicional, pero el coste y la mano de obra añadidos no se consideran

demasiado engorrosos en el ámbito de la investigación que es donde los criterios de clasificación tienen su lugar de aplicación.

En resumen, los anticuerpos anti-AcOrn han mostrado el mayor potencial para mejorar la exactitud de la actual clasificación de la AR. Este potencial se demostró con un sistema de puntuación basado en la concordancia de anticuerpos. La mejora afectó a la especificidad y la exactitud e hizo redundante la estratificación en función de los niveles de los anticuerpos. En cuanto a la sensibilidad, nuestros análisis no replicaron la elevada sensibilidad descrita para los AAPA en los pacientes con AR seronegativos. Como consecuencia, estos anticuerpos no fueron tan útiles para mejorar la sensibilidad con la que se clasifican los pacientes como se sugirió en trabajos previos. A pesar de que nuestros resultados son alentadores, deben tomarse con prudencia hasta que se confirmen en otras cohortes, particularmente en lo que respecta a los beneficios relativos que se pueden lograr con los anticuerpos anti-AcOrn y anti-CarP.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. POTENCIAL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ADUCTOS PROTEICOS DERIVADOS DE LA OXIDACIÓN CON MALONDIALDEHÍDO EN EL ESTUDIO DE LOS PACIENTES CON AR

Nuestros resultados han mostrado que la extraordinaria sensibilidad para la AR atribuida a los anticuerpos anti-MAA por el grupo de la Universidad de Nebraska no es reproducible [32,39]. Estos anticuerpos no alcanzaron ni siquiera una sensibilidad del 20% en nuestros pacientes que es mucho menor que la de los autoanticuerpos comúnmente analizados en la AR. Además, tampoco mostraron una elevada frecuencia en los pacientes seronegativos, el grupo en el que podrían ser potencialmente más útiles y donde se habían descrito como muy sensibles. La gran diferencia entre los resultados previamente publicados (con prevalencias de 92 y 80% para los anticuerpos IgG anti-MAA) y nuestros hallazgos motivó la realización de múltiples comprobaciones, en contacto con los autores de la descripción original, que solo sirvieron para confirmar nuestros resultados, ya que no fue posible encontrar una causa de la discordancia. Un estudio más reciente del grupo de Nebraska muestra resultados muy similares a los nuestros [365], por lo que se puede tomar como una replicación de nuestros resultados. Como consecuencia, la baja sensibilidad junto a la conocida falta de especificidad de los anticuerpos anti-MAA hace dudar de que tengan potencial diagnóstico en la AR y de que se puedan considerar como anticuerpos propios de la AR. Con independencia de la baja sensibilidad, podemos destacar que se han detectado los isotipos IgG, IgM e IgA de los anticuerpos anti-MAA así como los isotipos IgG e IgM de los anticuerpos anti-MDA en el suero de los pacientes con AR con niveles superiores a los detectados en los controles sanos y se ha demostrado que aunque los aductos de MAA y de MDA son dos PTM que provienen de la oxidación con malondialdehído y, a veces, se mencionen como indistintos, se trata de dos sistemas de anticuerpos independientes. Este es un aspecto notable pues no solo no se encontró evidencia de una correlación significativa en los niveles, sino que la concordancia fue similar a la que existe entre otros autoanticuerpos de la AR y, por lo tanto, no fue específica de estas dos PTM. Por otra parte, el análisis de la relación de los anticuerpos con algunas características de los pacientes ha mostrado una asociación de los anticuerpos IgM anti-MAA con el tabaco que resulta muy interesante desde el punto de vista patogénico y que será necesario estudiar con más detenimiento.

La búsqueda de las causas de la gran diferencia en sensibilidad entre los anticuerpos anti-MAA en nuestro estudio y en los de Thiele *y col.* [32] y Mikuls *y col.* [39] empezó por los detalles del ensayo utilizado. Dado que se empleó un ELISA que replicaba las condiciones descritas se puso énfasis en la preparación de la modificación postraduccional. Sin embargo, ninguna de las pruebas realizadas se acompañó de un aumento de la sensibilidad. Estas pruebas incluyeron el análisis del antígeno preparado en Nebraska, el uso de HSA de dos fuentes diferentes y el uso de MAA-HSA preparado con una ratio mayor de malondialdehído:acetaldehído. Además, se realizaron varios pasos de verificación que mostraron una adecuada formación del aducto MAA en la proteína y reproducibilidad de la modificación en el proceso de laboratorio. Además, el control de calidad de los ELISA mostró una alta especificidad por los aductos de MAA y reproducibilidad intra- e inter-ensayo. De esta forma se pudo descartar de forma razonable que las discrepancias se debieran al ensayo. Sin embargo, parece más difícil descartar que las diferencias en las características de los pacientes con AR puedan explicar, al menos en parte, la discrepante sensibilidad. Esto se debe

a que mientras que nuestros pacientes provienen de la población general en un área con poca diversidad étnica, los pacientes incluidos en los estudios de la Universidad de Nebraska provienen de la Administración de Veteranos de EE. UU. Por ello, mientras en nuestros pacientes las mujeres son el 77%, una cifra representativa de muchas series de pacientes con AR [130,176,217,366–372], los de la Universidad de Nebraska son en su mayoría hombres. Además, la mayoría de nuestros pacientes no han estado expuestos al tabaco, mientras que la mayoría de los veteranos lo han estado. Por último, todos nuestros pacientes son de origen europeo, y la gran mayoría español, a diferencia de los veteranos que incluyen pacientes de origen continental diverso. Ninguna de estos tres factores explica la diferente sensibilidad. De hecho, los anticuerpos anti-MAA de isotipo IgG fueron más frecuentes en las mujeres entre nuestros pacientes y sólo el isotipo IgA de los anticuerpos anti-MAA mostró una asociación con el género masculino en el estudio realizado por Thiele *y col.* [32]. Por otra parte, solo los anticuerpos IgM anti-MAA fueron más frecuentes y presentaron títulos más altos en los pacientes fumadores en comparación con los no fumadores tanto en nuestro estudio como en uno de los estudios previos [32]. Lamentablemente, en el en trabajo de Mikuls *y col.* [39] los análisis de asociación se realizaron de forma conjunta en pacientes con AR y artrosis y no es posible sacar ninguna conclusión al respecto. Las dos asociaciones mencionadas no explican la diferente sensibilidad, especialmente en relación con los anticuerpos IgG anti-MAA que fueron los que mostraron las diferencias más notables. Sin embargo, la ausencia de una causa relacionada con el sexo, el tabaco o el grupo étnico no es suficiente para excluir que las características de los pacientes estén detrás de la alta sensibilidad encontrada entre los veteranos americanos. Esto es así, porque además de las características mostradas por Thiele *y col.* [32] y Mikuls *y col.* [39], hay otras muchas que pueden sospecharse a partir de los datos epidemiológicos y socioeconómicos de los veteranos: frecuente uso de sustancias de abuso además del tabaco, incluyendo el alcohol y una alta prescripción de fármacos opioides [373–376], exposición a tóxicos inhalados que se ha relacionado con la producción de anticuerpos anti-CCP [377] y vacunaciones múltiples que pueden alterar las respuestas inmunes [378,379]. Además, los veteranos muestran un estado de salud peor que el de la población general tanto en salud mental y otros aspectos de salud general [374–376], como en enfermedades que se han asociado con la presencia de anticuerpos anti-MAA como la enfermedad coronaria [380,381] y enfermedades hepáticas por alcoholismo [382]. Esta incertidumbre persiste incluso tras considerar el estudio más reciente con pacientes con AR extraídos de un registro de militares americanos en servicio activo [365]. En estos pacientes, la sensibilidad de los anticuerpos anti-MAA de los tres isotipos es mucho más cercana a la que hemos observado nosotros que a los resultados obtenidos en los veteranos. Estos resultados son especialmente informativos pues el estudio fue realizado por los mismos autores de la Universidad de Nebraska y con el mismo ensayo. Las características más diferenciales de estos pacientes respecto a los veteranos o a nuestros pacientes son que las muestras se tomaron cuando eran mucho más jóvenes y con menos tiempo de evolución de la AR. Además, compartían con nuestros pacientes una menor frecuencia de fumadores y una mayor fracción de mujeres que las observadas en los veteranos. De nuevo, si se tiene en cuenta la información de otros estudios epidemiológicos se aprecia mejor el contraste, los militares en activo tienen un estado de salud que es mejor que el de la población general de la misma edad y sexo, mientras que los veteranos muestran un estado de salud peor que el de la población general [374,375]. También puede interpretarse en apoyo de las bajas prevalencias de los anticuerpos anti-MAA en la AR un estudio más reciente en pacientes suecos que realiza un análisis peculiar ya que no ajusta el umbral de positividad para discriminar entre los controles sanos y los pacientes. Con esta aproximación encuentran un 44% de pacientes con AR y un 15% de controles sanos que tienen IgG anti-MAA [204]. Por

lo tanto, todo parece indicar que una combinación de múltiples factores, que pueden incluir sexo, edad y exposición a tabaco, sea la causa de la elevada sensibilidad comunicada por los trabajos realizados en veteranos americanos [32,39].

Una característica notable de los resultados obtenidos en los veteranos americanos con AR es la alta prevalencia entre los pacientes seronegativos [32,39]. Esta propiedad hizo sospechar que en realidad no había pacientes con AR seronegativos, sino que lo único que faltaba era descubrir los autoanticuerpos que tenían [65,205]. Esta posibilidad, sin embargo, ya se podía ver desde un primer momento que iba a estar muy limitada por su falta de especificidad pues los mismos autores de la Universidad de Nebraska habían descrito niveles elevados de anticuerpos anti-MAA en pacientes con otras enfermedades [245,383]. Con posterioridad, la falta de especificidad se ha extendido a un rango más amplio de enfermedades [39,204,250], incluyendo algunas que pueden plantear problemas de diagnóstico diferencial con la AR, como artrosis, lupus eritematoso sistémico y espondiloartritis [39,204]. Por lo tanto, nuestros resultados solo han contribuido a completar la evidencia del pobre potencial de los anticuerpos anti-MAA como herramienta diagnóstica. Además, surgen dudas sobre si se pueden considerar como autoanticuerpos de la AR, ya que ni son específicos, ni muestran una prevalencia destacada que sea reproducible. Además, estos anticuerpos aparecen en algunos pacientes antes de que se manifieste la artritis pero con posterioridad a los anti-CCP y el FR, lo que puede interpretarse como que son secundarios a otros cambios [365]. De hecho, Wang et al. han aportado evidencias que apuntan a que se trata de anticuerpos naturales [257], esto es, anticuerpos que pueden estar presentes en todos desde el nacimiento a niveles bajos y que aumentan como respuesta a un aumento de los autoantígenos que reconocen, no como resultado de una pérdida de la tolerancia [384,385]. En el estudio de Wang *y col.*, los plasmas obtenidos de recién nacidos a término o incluso pre-término contenían anticuerpos IgM anti-MAA a niveles superiores a los de sus madres demostrando que eran anticuerpos naturales [257]. Además, estos anticuerpos fueron clonados y secuenciados con lo que se averiguó que mostraban muy poca evidencia de selección o mutaciones que es otra característica de los anticuerpos naturales. A pesar de esto, los anticuerpos se unieron a células endoteliales apoptóticas y a lesiones ateroscleróticas avanzadas, por lo que se pudo postular que participan en la regulación de la apoptosis y de la aterosclerosis [257]. Esta hipótesis sería más compatible con su asociación con la enfermedad coronaria [245], los aneurismas de aorta [383], las enfermedades hepáticas alcohólicas [250], la artrosis [39] además de con las enfermedades crónicas inflamatorias como la AR, el lupus y las espondiloartritis [32,39,204]. En todas estas enfermedades hay un aumento de la oxidación tisular que se acompaña de la producción de los MAA sin que todas sean enfermedades autoinmunes. Además, hay abundante evidencia experimental de que los anticuerpos IgM anti-MDA son anticuerpos naturales como se comentará más adelante [386,387]. Sin embargo, sería imprudente decantarse por esta interpretación, pues los autores de algunos trabajos han considerado que los niveles elevados de anticuerpos anti-MAA eran evidencia de un componente autoinmune en enfermedades como el aneurisma de aorta o las enfermedades hepáticas alcohólicas [250,383]. Es de esperar, que nuevos estudios nos permitan avanzar en la resolución de estas dudas.

Nuestros resultados también han diferenciado entre los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA. La falta de una concordancia en estado entre los anti-MAA y anti-MDA mayor que la observada con otros autoanticuerpos y la ausencia de correlación entre los títulos han mostrado que son dos sistemas de anticuerpos independientes. Así, las concordancias más altas observadas entre anticuerpos anti-MAA y anti-MDA son equivalentes a las observadas

entre anti-MAA y FR o anti-CCP y menores que las observadas entre FR, anti-CCP y anti-CarP. Este es un resultado que no se podía predecir dado que las dos PTM, MAA y MDA, son consecuencia de la presencia de malondialdehído en los tejidos en situaciones de aumento de la oxidación. La ausencia de una concordancia más marcada puede ser la consecuencia de ratios variables entre malondialdehído y acetaldehído durante la inflamación en la AR. En unos pacientes se favorecería la producción de MAA y en otros de MDA, y esto se reflejaría en la producción de anticuerpos frente a la PTM dominante. Este es un escenario puramente especulativo pues no se ha encontrado ningún estudio que compare los niveles de MAA y MDA a nivel tisular. Para confirmarlo haría falta ese tipo de estudio además de establecer una correlación entre los niveles de cada PTM y los de los anticuerpos. Por otra parte, solo se observó correlación en los niveles entre los IgG anti-MDA e IgA anti-MAA en los 6 pacientes que fueron positivos para los dos anticuerpos. Esta circunstancia hace que el resultado que predomine sea la ausencia de correlación entre las demás comparaciones. Esta ausencia de correlación muestra que con independencia de las posibles variaciones en los antígenos, el sistema inmune responde de forma diferencia frente a cada PTM. Previamente, nunca se había analizado la relación entre los dos anticuerpos en la forma que lo hemos hecho aquí, aunque sí se había analizado mediante ensayos de competición *in vitro* y de comparación de los títulos medios de los anticuerpos (más altos o más bajos). Estos ensayos habían mostrado muy poca competición y correlación entre los dos tipos de anticuerpos que se atribuyó a la posible presencia de contaminación por acetaldehído en las reacciones para producir MDA [257]. Sin embargo, el análisis de un anticuerpo monoclonal aislado como anti-MDA que mostraba mayor afinidad por MAA que por MDA ha motivado que los autores de ese trabajo se refieran de forma indistinta a los dos tipos de anticuerpos [33,204]. Esta postura la expresaron a pesar de que encontraron una prevalencia de anticuerpos anti-MDA en la AR mucho menor que la descrita en esas fechas para los anti-MAA [33,204] y de que no se espera que haya reactividad cruzada en el reconocimiento de aductos de MAA y MDA. En efecto, la formación de los aductos de MAA y de MDA implica la unión covalente del malondialdehído con el grupo amina de los aminoácidos presentes en las proteínas, principalmente el grupo amina en posición épsilon de las lisinas, aunque también pueden modificarse otros aminoácidos con grupos funcionales de tipo amina y en menor medida aminoácidos con grupos amida [26,33]. La estructura mayoritaria formada tras la reacción de aducción de las proteínas únicamente con MDA es el compuesto linear no fluorescente N-ε-(2-propenal)lisina (aducto MDA) [255]. La estructura de esta modificación postraduccional es completamente diferente a la que presenta el compuesto cíclico fluorescente mayoritario N-ε-(4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldehído)lisina formado cuando el malondialdehído y el acetaldehído reaccionan de forma conjunta (aducto MAA) [238]. Por lo tanto, es poco probable que los anticuerpos dirigidos frente a los aductos de MAA reconozcan también los aductos de MDA por mecanismos de reactividad cruzada.

Aunque nuestros resultados y los experimentos de competición muestren que los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA son independientes, hay una serie de características que comparten. Así, los dos han mostrado poco potencial como biomarcadores diagnósticos en la AR. En efecto, los anticuerpos anti-MDA son poco sensibles y poco específicos como ya hemos comentado para los anti-MAA. La falta de sensibilidad (28% o menor) estaba presente en el estudio en el que se describieron en pacientes con AR [33], y se confirmó en nuestros pacientes. La falta de especificidad para la AR se evidenció al encontrar elevaciones de estos anticuerpos anti-MDA de magnitud similar a la observada en pacientes con AR en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica [262], lupus eritematoso sistémico [258,388,389] y otras

conectivopatías [389]. Quizás más interesante que la falta de valor diagnóstico es que los anticuerpos anti-MDA también se han considerado anticuerpos naturales [386,387]. Se han detectado en neonatos a niveles superiores a los de sus madres los de isotipo IgM y poco más tarde del nacimiento los de isotipo IgG [386,387]. Además, reconocen células apoptóticas y ayudan a que sean fagocitadas por lo que se ha propuesto que su papel fisiológico es participar en su eliminación [387,390]. Estos resultados habían sido precedidos por la demostración de anticuerpos anti-MDA como anticuerpos naturales en ratones, en los que además se demostró que la inyección de células apoptóticas induce un marcado aumento de sus niveles [391]. Muchos de los estudios de anticuerpos naturales se han centrado en los anticuerpos anti-fosforilcolina, y estos se han mostrado protectores frente a inflamación y aterosclerosis [392], incluyendo protección frente aterosclerosis en pacientes con AR [393]. Aunque la evidencia es mucho menor, hay algún estudio que muestra que los anticuerpos anti-MDA de isotipo IgM también son protectores frente a aterosclerosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico [390]. Pero este efecto no se ha confirmado en otro estudio de pacientes con lupus eritematoso sistémico en el que no se observó asociación ni con la aterosclerosis, ni con la actividad [260] y no hay información sobre cuál puede ser su papel en relación con la aterosclerosis o la actividad inflamatoria en pacientes con AR. Lo que sí se ha observado en AR [33], y en lupus eritematoso sistémico [258,260], es que los anticuerpos anti-MDA de isotipo IgG se correlacionan positivamente con la actividad inflamatoria medida de diversas formas. Por lo tanto, se ha propuesto que hay una diferencia importante entre los anticuerpos anti-MDA IgM e IgG que no existe en los anticuerpos anti-fosforilcolina, de forma que los anti-MDA IgM serían anticuerpos naturales mientras que los anti-MDA IgG serían patogénicos [33,260,392]. Sin embargo, en los estudios en los que se basa esta interpretación no se ha analizado cómo se relacionan los dos isotipos [33,260]. La información obtenida en nuestros pacientes hace suponer que la elevada concordancia y la correlación significativa de los niveles de los dos isotipos cuestionarían el que tengan papeles opuestos. Lamentablemente, no disponemos de información sobre la actividad de la AR en nuestros pacientes con la que analizar su relación con los dos isotipos de anti-MDA. Por otra parte, nuestros pacientes no replicaban uno de los argumentos utilizados para considerar que los anticuerpos IgG anti-MDA no son anticuerpos naturales. Se trata de que los niveles de IgG anti-MDA en los controles sanos eran bajos o indetectables, mientras que los IgM anti-MDA eran detectables como corresponde a un anticuerpo natural [33]. En nuestros pacientes los dos isotipos de anti-MDA mostraron reactividad equivalente en los controles sanos cuando se comparaban las absorbancias obtenidas en ELISA realizados simultáneamente. Ninguna de estas comparaciones puede tomarse más que como indicativa ya que solo permiten cuantificaciones relativas, pero la comparación de absorbancias nos parece más valorable que la de unidades relativas o arbitrarias que requiere que el estándar tenga la misma reactividad IgG e IgM anti-MDA. Además, los mismos autores comunicaron niveles equivalentes de anticuerpos IgG e IgM anti-MDA en los controles sanos de otro estudio [260]. Por último, se debe señalar que no se ha excluido la posibilidad de que la elevación de los IgG anti-MDA en pacientes con alta actividad sea una respuesta frente al aumento de antígeno producido por la elevada inflamación en lugar de un factor contribuyente a la misma.

La frecuencia de pacientes positivos para los anticuerpos IgM anti-MDA fue comparable en nuestros pacientes y el único estudio previo en AR [33], pero la de los anticuerpos IgG anti-MDA fue notablemente menor. Esta diferencia es difícil de atribuir al ensayo pues fueron similares y produjeron resultados equivalentes para los anticuerpos IgM. Quizás sea más probable que la diferencia radique en las características de los pacientes. La comparación

directa no pudo realizarse debido a la falta de disponibilidad de datos para la cohorte completa de pacientes de Grönwall *y col.* Sin embargo, nuestros pacientes tenían AR establecida con un tiempo medio de seguimiento de 14 años, mientras que los pacientes estudiados por Grönwall *y col.* incluían un 22.8% de pacientes con menos de 6 meses desde el inicio de los síntomas y sin tratamiento con FAMEs y otro 20.8% de pacientes con entre 6 y 2 años desde el inicio de los síntomas. Los pacientes del primer grupo mostraron un nivel más alto de anticuerpos anti-MDA que los demás debido a que mostraban una actividad de la enfermedad más elevada. Por lo tanto, es probable que la presencia de este grupo de pacientes con AR sin tratar justifique la mayor prevalencia de IgG anti-MDA que encontraron.

La única asociación de los anticuerpos anti-MAA o anti-MDA con características clínicas que se demostró en nuestros pacientes fue la existente entre la IgM anti-MAA y hábito fumador. Esta asociación presentó características que indican su verosimilitud pues se observó tanto con la prevalencia como con los niveles de anti-MAA y fue más marcada en los que seguían fumando que en los exfumadores. Además, solo el isotipo IgM anti-MAA estuvo asociado con seguir fumando en los veteranos americanos coincidiendo con nuestros resultados [32]. Esta especificidad de la asociación con los anticuerpos de isotipo IgM no tiene ninguna justificación conocida. Sin embargo, la asociación de los anticuerpos anti-MAA con la exposición al tabaco se puede explicar por el aumento de MAA. En efecto, el humo del tabaco contiene entre sus componentes carbonilos reactivos, predominantemente acetaldehído [85], e induce procesos de estrés oxidativo en los tejidos que dan lugar a la LPO [394]. Uno de los aldehídos más abundantes derivados de la LPO es el malondialdehído, que puede descomponerse en acetaldehído [243]. De hecho, hay cierta evidencia que sugiere que los aductos de MAA podrían formarse en los pulmones como consecuencia de la exposición al humo del tabaco, provocando la inflamación y la producción de anticuerpos anti-MAA [251,252]. Una limitación de nuestro estudio que ya hemos señalado es la falta de datos de medidas de la actividad de la enfermedad en nuestros pacientes con AR. Esta información sería útil para comparar con los datos previos de asociación con anticuerpos anti-MDA como ya se ha discutido. En más detalle, Gronwäll *y col.* encontraron correlaciones significativas entre los niveles de anticuerpos IgG anti-MDA y VSG, PCR y DAS28 así como correlaciones con las moléculas proinflamatorias factor de necrosis tumoral α (TNF-α), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 17F (IL-17F) [33].Además, existen evidencias previas de una relación entre el componente inflamatorio de la AR y la presencia de anticuerpos dirigidos frente a MAA. Thiele *y col.* observaron una asociación entre los títulos de los anticuerpos IgA anti-MAA y la actividad de la AR medida como DAS28 y una tendencia para los títulos del isotipo IgM [32]. También observaron una asociación entre los niveles de anticuerpos anti-MAA y los marcadores de inflamación VSG y PCR. Por todo ello, el análisis de marcadores de actividad sería un complemento enriquecedor de nuestro estudio. Otra limitación que afecta tanto a nuestro estudio como a los previos es que la determinación del valor diagnóstico de los anticuerpos más apropiada requiere de otro tipo de pacientes.

En efecto, aunque los trabajos realizados hasta ahora incluyendo el nuestro permiten evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA por la AR, no son adecuados para evaluar la utilidad de estos anticuerpos en la clasificación de los pacientes con AR en etapas tempranas de la enfermedad donde es más necesario [395,396]. Para este fin sería adecuado estudiar pacientes incluidos en cohortes de artritis de reciente comienzo.

4. RELEVANCIA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS CARBONILADOS, NITRADOS Y HOMOCISTEINILADOS EN PACIENTES CON AR

En este trabajo se ha evaluado la presencia de tres tipos de anticuerpos que reconocen modificaciones postraduccionales poco estudiadas hasta ahora, concretamente carbonilación, nitración y homocisteinilación. Ninguno de los anticuerpos ha mostrado reactividad específica en nuestros pacientes ya que los niveles de anticuerpos frente a las proteínas modificadas postraduccionalmente fueron similares a los niveles de anticuerpos frente a las proteínas no modificadas correspondientes, especialmente para el CII modificado con HOCl y para las proteínas sinoviales homocisteiniladas y nitradas. Estos resultados indican que el reconocimiento de las modificaciones postraduccionales analizadas aquí por los anticuerpos de los pacientes con AR es limitado. Sin embargo, algunos anticuerpos analizados sin corregir mostraron elevaciones significativas en los pacientes con AR, un resultado que puede explicar las publicaciones previas que habían mostrado estos anticuerpos y que no incluyeron una corrección por la reactividad frente a las proteínas sin modificar.

Nuestros controles sanos mostraron una reactividad frente al CII nativo que fue superior a la observada en los pacientes con AR. También la reactividad frente al HOCl-CII sin corregir fue mayor en los controles. Solo los anticuerpos anti-GLI-CII estuvieron significativamente más elevados en los pacientes que en los controles una vez substraídas las absorbancias frente al CII nativo y esta elevación, aunque estadísticamente significativa, fue pequeña. Estos resultados pueden parecer sorprendentes teniendo en cuenta que el CII se considera un antígeno de la AR y los resultados previos indicando la presencia de anticuerpos anti-HOCl-CII y anti-GLI-CII [30,36,37,397–405], pero no lo son tanto cuando se analiza críticamente el conjunto de la evidencia previa.

En cuanto al papel del CII como antígeno de la AR, hay que tener en cuenta que es un antígeno cuyo estudio ha ido decayendo debido a los muchos problemas encontrados al determinarlo, y porque ha sido imposible establecer que tenga un papel específico en la patogenia de la AR [406,407]. Una de las razones por la que se duda del papel de los anticuerpos anti-CII en la AR es que se han encontrado elevados en múltiples enfermedades, sin que haya un nexo común entre ellas, ya que muchas no incluyen un componente autoinmune, inflamatorio o incluso articular [406,407]. También contribuye a las dudas sobre su papel en la patogenia que estos anticuerpos no se han encontrado elevados en los pacientes con artralgias que son ACPA positivos y que, por lo tanto, están en alto riesgo de desarrollar AR [37,408]. En contraste, los anticuerpos de la AR mejor caracterizados, ACPA, FR y anti-CarP, están aumentados bastantes años antes del inicio de la artritis clínica [90,94,119,134–137]. Los argumentos que apoyan la participación de los anticuerpos anti-CII en la AR incluyen principalmente su presencia en los pacientes, a niveles más altos en el líquido sinovial que en el suero, y la inducción de artritis en animales de experimentación al inmunizarlos frente al CII, el modelo animal de la AR más utilizado [409,410]. Sin embargo, el argumento basado en la presencia de anticuerpos en los pacientes tiene muchas limitaciones. Así, hay varios trabajos en los que no se han encontrado los anticuerpos anti-CII nativo con mayor frecuencia o nivel en los pacientes con AR que en los controles [408,411,412]. De hecho, se ha demostrado la presencia de células B productoras de anticuerpos anti-CII en los 9 sujetos analizados que incluían 5 con AR y 4 controles sanos [413]. Cuando se han encontrado anticuerpos anti-CII con mayor

frecuencia en pacientes con AR establecida, la frecuencia que se ha comunicado varía desde el 5% hasta el 94% [36,37,397–405,414], También contribuye a la incertidumbre que varios estudios encontraron más anticuerpos en la AR de reciente comienzo que en la AR establecida [400,415,416], llegando a observarse una reducción del 70% de los pacientes positivos en uno de los estudios [415]. Sin embargo, el rango de prevalencias publicadas en los pacientes con AR de reciente comienzo es tan amplio como en los pacientes con AR establecida, con valores entre el 4 y el 75% [37,400–403,414], por lo que tampoco se puede concluir que sean más comunes en este grupo de pacientes.

Se desconocen las causas de tanta variabilidad, aunque hay algunas sospechas fundadas. Los factores posibles incluyen el uso de diferentes métodos para la determinación de los anticuerpos, diferentes puntos de corte y ajustes para definir la positividad de los anticuerpos, un número insuficiente de muestras tanto de pacientes como de controles, o diferencias en las características clínicas de los pacientes con AR. Parece que las prevalencias más elevadas se obtuvieron en los años 1970 y 80 con estudios pequeños y técnicas inapropiadas para la cuantificación como la hemaglutinación pasiva o la inmunofluorescencia [406,407,417]. Otra causa probable de variabilidad está en el antígeno empleado, pues quizás ha habido insuficiente atención a la naturaleza del CII utilizado. El más frecuente es el CII extraído de cartílago bovino, ya que se observó una muy buena correlación en los pacientes con AR entre él y el colágeno humano y, en general, amplia reactividad cruzada frente al CII de varias especies tanto en los sueros de los pacientes [418] como en los experimentos con animales [409,410]. Sin embargo, la preparación del CII afecta a los resultados pues se ha demostrado una mayor prevalencia de anticuerpos y una mayor inespecificidad cuando se ha usado CII desnaturalizado en comparación con el CII nativo [406,407,412,418]. También se han descrito contaminantes del CII como fibronectina [407], proteoglicanos [419] que no se habían eliminado suficientemente al purificar el CII y la pepsina utilizada para digerir el cartílago y que permanecía en la preparación final [419,420]. Estos contaminantes daban lugar a falsos positivos y a un aumento de la inespecificidad. Nosotros hemos utilizado CII nativo que había sido extraído con gran pureza (>99% evaluada con SDS-PAGE) de cartílago fetal bovino mediante precipitación diferencial con sales (MDbioproducts, 804001) por lo que no hay razones para dudar de su calidad.

En contraste con el antígeno, el método de detección, una vez excluidos los métodos inadecuados utilizados hace décadas, parece poco probable que tenga una influencia importante en la variabilidad de los resultados. El ensayo más utilizado es el ELISA y los protocolos muestran pocas diferencias significativas entre sí. De hecho, nosotros hemos seguido con pequeñas modificaciones un protocolo previamente publicado por Nissim *y col.* [30] y que ha sido seguido en otros trabajos [36,37]. Un aspecto del protocolo de estudio que sí parece tener una influencia notable es el análisis e interpretación de los resultados. Se observan diferencias en la forma de analizar la positividad en relación con la reactividad de fondo y el punto de corte. Estas diferencias tienen un gran impacto en anticuerpos que están presentes a niveles bajos como los anti-CII. Por ejemplo, algunos estudios utilizan como punto de corte un percentil de los niveles observados en los controles, pero este puede ser el 95% o el 98%. Otros utilizan la media + 2SD o 3SD de los anticuerpos en los controles que son definiciones cuestionables debido a la distribución sesgada de los anticuerpos. Así, si nosotros hubiésemos utilizado la media + 3SD tendríamos 1.6% pacientes con anticuerpos anti-CII, mientras que con el percentil del 98% la frecuencia sería de 2.2 y con el percentil del 95% sería del 4.9%. También hay autores que eliminan los controles que tienen niveles altos

al considerarlos outliers, o que eliminan algunos controles porque los consideran como uniones inespecíficas [36,402]. En cuanto a la reactividad de fondo, se analiza de formas diferentes y no se corrige o se corrige substrayéndola de la OD observada. Nosotros hemos observado una reactividad despreciable frente a los pocillos sin antígeno y no la hemos substraído de las absorbancias.

Finalmente, la variabilidad entre estudios puede radicar en los sujetos estudiados, tanto pacientes como controles. Estos últimos son importantes porque se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-CII en muchas enfermedades [406,407], por lo que algunos pacientes pueden incluirse entre los controles de forma inadvertida. Nosotros hemos comprobado que no había relación entre los niveles de anticuerpos anti-CII y la edad y sexo de nuestros controles que habían sido seleccionados por presentar un buen estado general de salud. En cuanto a los pacientes con AR, la mayor controversia ya se ha mencionado y está relacionada con el tiempo de evolución de la AR [37,400–403,414–416]. Pero una vez que se excluye ese factor y se limita el análisis a los estudios con AR de reciente comienzo, se puede observar con claridad que el factor paciente no parece haber sido determinante ya que todos los pacientes tienen unas características muy similares y, sin embargo, los resultados son muy variables [37,400–403,414]. Nosotros utilizamos pacientes con AR de reciente comienzo para evitar esta fuente de incertidumbre y para aumentar la sensibilidad del estudio en caso de que la prevalencia disminuyera con el tiempo de evolución. Por esta misma razón, separamos los pacientes con menos de un año de evolución y los que no habían recibido ningún DMARD, como grupos que podrían tener mayor prevalencia de los anticuerpos. Ninguno de estos subgrupos mostró resultados diferentes del análisis conjunto.

En resumen, parece que los anticuerpos anti-CII nativo estudiados con métodos apropiados deben encontrase con frecuencias de alrededor del 10% como ya comentaban hace años algunos expertos [406,407] y como ha confirmado recientemente el estudio más grande y mejor controlado que se ha realizado [402]. Este estudio incluyó pacientes con AR de reciente comienzo de Suecia pertenecientes a la cohorte EIRA (*Epidemiological Investigation in Rheumatoid Arthritis*). Los anticuerpos anti-CII nativo se analizaron en 773 pacientes en la primera visita y 960 controles emparejados por residencia, edad y sexo y encontró una prevalencia del 7.2% utilizando como punto de corte el percentil 95% de los controles [402]. Con ese mismo percentil, nuestros pacientes con AR mostraron anticuerpos anti-CII nativo con una frecuencia que es similar, del 4.9%.

Nuestros resultados también contrastan con los trabajos previos en referencia a los anticuerpos anti-CII carbonilados. Hay tres trabajos de este tipo en pacientes con AR [30,36,37]. En el primero de los estudios, Nissim *y col*. estaban especialmente interesados en mostrar que había más reactividad frente a CII modificado que frente al nativo, y en efecto, las absorbancias obtenidas en los ELISA fueron significativamente más altas frente a HOCl-CII y GLI-CII que frente a CII nativo [30]. Pero este resultado no fue específico de la AR, pues se obtuvo tanto en los pacientes con AR como sin AR pero con otras enfermedades musculoesqueléticas. Cuando compararon los pacientes con AR y sin AR encontraron que los anticuerpos anti-HOCl-CII tenían niveles significativamente más altos en los pacientes con AR, mientras que los anticuerpos anti-GLI-CII no fueron diferentes entre los dos grupos de pacientes. El estudio no incluyó controles sanos. Esta limitación se subsanó en un estudio posterior del mismo grupo [37]. En él, Strollo *y col*. incluyeron controles sanos, pacientes con otras enfermedades y pacientes con AR. Estos últimos se dividían en pacientes con AR de

reciente comienzo y sin tratar con FAME, y pacientes con AR establecida. Los niveles más altos de anticuerpos anti-HOCl-CII y anti-GLI-CII se encontraron en los pacientes con AR de reciente comienzo y sin tratar que mostraron un 92.9% de anticuerpos anti-HOCl-CII y un 64.7% de anti-GLI-CII en comparación con un 18.8% de anticuerpos anti-CII nativo. Estas frecuencias fueron mucho mayores que las observadas en los dos grupos de controles, sanos y con otras enfermedades. También fueron mucho mayores que las obtenidas en pacientes con AR establecida, donde los anticuerpos anti-HOCl-CII y anti-GLI-CII estuvieron presentes con la misma frecuencia, 32%, mientras que los anti-CII nativo tuvieron una frecuencia similar, el 22%. En el tercer estudio, Xie *y col*. analizaron solo los anticuerpos anti-GLI-CII y anti-CII nativo en pacientes con AR o con artrosis, y en controles sanos [36]. Los anticuerpos más frecuentes fueron los anti-GLI-CII en pacientes con AR (44.4%) y con artrosis (29.8%), mientras que los anti-CII nativo estuvieron presentes con la misma frecuencia en los pacientes con AR y con OA (17.3%). Por lo tanto, los tres estudios mostraron un aumento de los anticuerpos frente al CII carbonilado en relación con el CII nativo y los tres mostraron que, al menos, uno de los anticuerpos anti-CII carbonilado era más frecuente en los pacientes con AR en comparación con otros pacientes o controles sanos. Nosotros encontramos un aumento en los niveles de los anticuerpos anti-GLI-CII en relación con los anticuerpos anti-CII nativo en los pacientes con AR y también un aumento de estos anticuerpos anti-GLI-CII en relación con los controles sanos, lo que podría considerarse que replica los resultados previos. Sin embargo, nuestra interpretación es diferente pues el aumento de niveles observado es muy pequeño, sin que haya un subgrupo de pacientes que se puedan considerar claramente positivos.

El aspecto en el que los estudios previos y el nuestro fueron diferentes y que podría tener una mayor influencia en los resultados, es que nosotros substrajimos las absorbancias frente a CII nativo, mientras que ninguno de los otros estudios lo hizo. Como alternativa, lo que substrajeron fue la absorbancia frente a la BSA carbonilada con el mismo reactivo, HOCl-BSA para los anticuerpos anti-HOCl-CII, y GLI-BSA para los anticuerpos anti-GLI-CII [30,36,37]. Nosotros consideramos que es necesario substraer la reactividad frente a CII nativo para establecer la especificidad de los anticuerpos. Esta corrección por la proteína nativa (o por un péptido sin modificar) se ha empleado en varios estudios que evalúan la presencia de anticuerpos con reactividad específica frente a otras modificaciones postraduccionales, como los anticuerpos anti-CarP [43], anti-MAA [32] y ACPA [350] y se ha mostrado que la corrección de la reactividad frente a péptidos citrulinados por la reactividad de los respectivos péptidos control aumenta la sensibilidad y la fuerza de las asociaciones [325]. En consecuencia, la frecuencia de los anticuerpos anti-Carbo-CII podrían estar sobreestimados en los otros estudios [30,36,37], al considerar como positivos pacientes que únicamente presentaban reactividad frente a CII nativo. Por el contrario, al substraer la reactividad frente a BSA carbonilada se corre el peligro de reducir los anticuerpos que reconocen la modificación, ya que en otras modificaciones postraduccionales los anticuerpos reconocen con preferencia la modificación y no la proteína sobre la que se encuentra [332]. Además, una fracción elevada de la población tiene anticuerpos anti-BSA en el suero [421,422]. Una reactividad que también se ha encontrado en los pacientes con AR [423] y que podría alterar los resultados al realizar la corrección utilizada en los tres estudios de anticuerpos anti-Carbo-CII previos.

También hemos considerado otras posibles causas de los resultados discrepantes, pero todas ellas parecen menos probables. En primer lugar y como ya se ha comentado, los anticuerpos anti-CII nativo presentan muchos problemas y es posible que los anti-Carbo-CII

arrastren esas limitaciones de falta de reproducibilidad y especificidad. Sin embargo, pensamos que no se puede atribuir un papel al CII, pues el CII que hemos usado nosotros es el mismo que han usado Xie *y col.* [36]. Tampoco parece que la diferencia resida en la carbonilación o el protocolo de ELISA ya que todos los estudios hemos utilizado los mismos protocolos de carbonilación y de ELISA, los descritos por Nissim *y col.* [30]. Además, la verificación de la carbonilación de CII en nuestro estudio se ha llevado a cabo empleando varias técnicas siguiendo protocolos establecidos [16,30,267,315,316], y todos los resultados apuntaron hacia una adecuada modificación sin degradación o agregación significativas del CII. Así, las medidas de fluorescencia y del ensayo con DNPH mostraron formación de AGEs y aumento de los niveles de grupos carbonilo. Estas comprobaciones también mostraron que la carbonilación no provocó una fragmentación apreciable del CII, ni la formación masiva de agregados. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Nissim *y col.* [30]. También de forma similar a lo ya sabido en proteínas modificadas con azúcares reductores [30,304,307,424–426], la reacción de carbonilación con ribosa provocó la disminución de la movilidad electroforética del CII. Por su parte, la verificación de la modificación de la BSA, empleada como control ya que hay bibliografía para comparar, también coincidió con lo publicado previamente [267,424,427]. Otra observación obtenida de las verificaciones es que la reacción con ribosa fue más efectiva, produciendo hasta 3 veces más grupos carbonilo que la oxidación con HOCl en el CII. Pero no es probable que esta diferencia tuviese repercusión en los resultados ya que el nivel de modificación fue suficiente con ambos reactivos. Otra característica destacable es que el contenido de carbonilos en el CII nativo fue 4 veces superior al de la BSA nativa. Esta observación no es inesperada ya que la presencia de grupos carbonilo en el CII nativo se ha descrito previamente [428,429]. Tampoco es una característica que deba considerarse como importante al comparar nuestros resultados con estudios previos, pues, como ya se ha comentado, utilizamos el mismo CII que Xie *y col.* [36], y la carbonilación *in vitro* aumentó significativamente los niveles de carbonilos. Por último, se puede señalar que nosotros introdujimos algunos cambios en los tiempos de incubación y el reactivo de bloqueo de los ELISA ya que mostraron mejores resultados en experimentos preliminares, pero no son suficientes para explicar las diferencias encontradas. Por otra parte, se utilizaron múltiples medidas para asegurar la reproducibilidad del ELISA: se empleó el mismo lote de colágeno nativo y modificado para evaluar el suero de todos los pacientes y controles, se incluyeron en la misma placa sueros de pacientes y de controles y se aplicó un control de calidad intra- e inter-ensayo. Tampoco las características clínicas y serológicas de los pacientes parecen haber influenciado significativamente los resultados. Así, aunque se observan algunas diferencias en la información disponible entre nuestros pacientes y los estudiados en trabajos previos, ninguna de esas diferencias es consistente. Por ejemplo, nuestros pacientes eran algo mayores y tenían más tiempo de evolución de la enfermedad que los estudiados por Strollo *y col.* [37], pero tenían menos años y menos evolución de la AR que los estudiados por Xie *y col.* [36]. El posible efecto de la exposición al tabaco, que tampoco se considera probable, se discute conjuntamente con los anticuerpos anti-3N.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Exploramos la presencia de anticuerpos frente a proteínas nitradas ya que hay un aumento de las especies reactivas de nitrógeno y de proteínas nitradas en la sinovia inflamada de la AR [18,28,29,430–432], y un trabajo ha mostrado anticuerpos de este tipo en pacientes con AR [35]. Un ejemplo del aumento de especies reactivas de nitrógeno es la mayor producción de especies

derivadas de NO en el líquido sinovial [18,430], especies precursoras del ONO_2^- con capacidad para nitrar proteínas. Además, se ha observado un incremento de los niveles de 3-NT libre [431] y de proteínas nitradas [28,29,430] en el suero y en el líquido sinovial de pacientes con AR en comparación con sujetos sanos. Otra evidencia es la tinción con anticuerpos anti-3-NT en cortes histológicos de tejido sinovial [28,432], y en extractos de proteínas sinoviales de pacientes con AR [28]. La formación local de proteínas nitradas podría actuar como desencadenante de la respuesta autoinmune mediada por anticuerpos al igual que se ha propuesto para otros anticuerpos anti-PTM en la AR como los ACPA [433–435], anti-CarP [436,437], anti-MAA [32,34] y anti-MDA [33]. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que no había reactividad específica frente a ninguno de los dos tipos de antígenos empleados.

Seleccionamos los antígenos para que los resultados fuesen informativos sobre la patogenia de la AR. Por una parte, un extracto de proteínas sinoviales, pues la sinovia es el tejido afectado de una forma más consistente en todos los pacientes y durante todas las fases de la artritis clínica [438]. Por otra, péptidos seleccionados en proteínas relevantes y con una alta probabilidad de estar nitrados *in vivo*. Esta forma de proceder es similar a lo que se ha hecho con otros autoanticuerpos en la AR. De hecho, todos los péptidos eran de proteínas que compartían ser diana de autoanticuerpos en la AR, ya sea de los ACPA [332,439,440] o de anticuerpos específicos de las proteínas sin modificar [441], y tener un tamaño molecular en el rango de las proteínas que están nitradas de forma más prominente en la sinovitis [28]. Además, el uso de péptidos sintéticos nos ha permitido argüir que la ausencia de anticuerpos específicos usando proteínas no era atribuible a que la preparación control contenía ya algunas proteínas nitradas. El nivel de nitración en las proteínas control era 10 veces menor que tras la nitración *in vitro*, por lo que es muy improbable que fuese suficiente para alcanzar la señal obtenida frente a las tratadas. Al obtener el mismo resultado con los péptidos, se excluyó cualquier duda en este sentido. El bajo grado de nitración de las proteínas sinoviales sin tratar no es sorprendente, ya que el extracto de proteínas provenía de pacientes con artrosis en los que se ha mostrado la presencia, aunque a un nivel menor que en la AR, de especies reactivas de nitrógeno y de proteínas nitradas [18,28,29]. Tampoco es posible dudar con fundamento de lo adecuado de la nitración de las proteínas ya que se verificó con dos métodos, mediante análisis de fluorescencia y absorbancia previamente descritos [301], y con un ensayo ELISA comercial adecuado para muestras de origen biológico, confirmándose en todos los casos la formación de 3-NT en las proteínas tratadas.

Las mencionadas características de nuestros ensayos permiten interpretar los resultados como indicativos de la ausencia de anticuerpos específicos de proteínas nitradas en los pacientes con AR. Sin embargo, hay dos estudios que parecen indicar lo contrario [30,35]. El que presenta los resultados de una forma más detallada está muy alejado de nuestro diseño y análisis [35]. En primer lugar, el antígeno utilizado fue poli-L-tirosina que al ser nitrado *in vitro* puede llegar a presentar un grupo de nitrotirosina en cada aminoácido. Por otra parte, se utilizaron como muestras las IgG purificadas con una columna conteniendo proteína A a partir de sueros y de líquidos sinoviales. Todas las preparaciones de IgG provenientes del suero de pacientes (n = 60) mostraron anticuerpos frente al polipéptido nitrado a niveles elevados. Como ninguna de las preparaciones de IgG provenientes de suero de controles (n = 30) mostró cantidades comparables de anticuerpos, el contraste fue sorprendentemente definido. Sin embargo, fue inespecífico de la AR pues los pacientes incluían pacientes con artrosis y con LES. Por otra parte, no se analizó, ni se corrigió por la reactividad frente a la poli-L-tirosina sin modificar. Por último, un ELISA competitivo con el mismo antígeno (3-NT-poli-

L-tirosina) realizado en todas las muestras produjo una reducción media del 44% (entre el 12 – 84%) de las absorbancias, lo que parece insuficiente. Por todas estas características, parece razonable dudar que este trabajo muestre la presencia de anticuerpos específicos de proteínas nitradas en la AR. El segundo trabajo que indica la presencia de estos anticuerpos ya se ha comentado en relación con los anticuerpos frente a proteínas carboniladas [30]. La proteína analizada fue el CII, y se comparó la reactividad frente a 3-NT-CII y al CII nativo en pacientes con AR obteniendo OD medias significativamente diferentes, 0.35 y 0.20, respectivamente [30]. Sin embargo, la misma relación entre los niveles de anticuerpos anti-3-NT-CII y anti-CII nativo se obtuvo en los pacientes sin AR (con otras enfermedades inflamatorias, lumbalgia, osteoporosis y gota), y no hubo diferencias entre los niveles de los pacientes con AR y los pacientes sin AR [30]. Como el estudio no incluyó controles sanos, no es posible saber si habrían mostrado también más anticuerpos anti-3-NT-CII que anti-CII nativo. Además, el CII es un componente minoritario de otros tejidos aparte del cartílago, por lo que el diferencial de reactividad observado entre sus formas nitrada y nativa no se puede comparar con nuestro análisis de proteínas sinoviales. Por lo tanto, no está claro que este estudio se pueda interpretar como contrario a lo observado en nuestros pacientes.

Como las características de los pacientes pueden afectar los resultados de todos los anticuerpos anti-PTM considerados, parece necesario discutir una característica relativamente peculiar de nuestros pacientes: la baja frecuencia de fumadores. Esta característica podría tener repercusión porque varios estudios han mostrado que el tabaco predispone a la autoinmunidad y, más específicamente, a la producción de autoanticuerpos [47,76]. Los mecanismos por los que el tabaco puede contribuir a la autoinmunidad son múltiples y no se conocen completamente, pero hay un mecanismo que es muy relevante en nuestro contexto. Se trata de la contribución del tabaco a la producción de PTM, ya sea directamente por exposición a compuestos presentes en el humo de tabaco [85], o como consecuencia de la actividad inflamatoria inducida por el humo sobre las vías respiratorias [442]. Este modelo se puede aplicar a la carbonilación y a la nitración de proteínas ya que el humo de los cigarrillos contiene sustancias reactivas que podrían causar las dos modificaciones de forma directa o indirecta mediante la inducción de inflamación y de estrés oxidativo que conduce a la generación de ROS y RNS [30,327,429,443]. Una vez producidas las PTM actuarían como neoepítopos que pueden ser dianas de una respuesta autoinmune [442]. Lo que falta para que la hipótesis sea más completa es que se identifique una relación entre tabaco y los anticuerpos anti-Carbo y anti-Nitra, pero no se ha comunicado en ningún estudio. Por lo tanto, el hecho de que el 30% de nuestros pacientes en el estudio de anti-CII carbonilado tenían historia de tabaquismo en comparación con el 62% de los pacientes estudiados por Xie *y col.* [36] puede estar contribuyendo a los resultados diferentes aunque sin ninguna evidencia adicional. De hecho, ni siquiera se dispone de información sobre tabaquismo en los otros estudios sobre los anticuerpos anti-CII carbonilado [30,37] o anti-3-NT [30,35].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

La ausencia de anticuerpos específicos frente a proteínas de sinovia homocisteiniladas en nuestros pacientes con AR contrasta con otros dos estudios que también han analizado proteínas homocisteiniladas en pacientes con AR [31,38]. El primero detectó reactividad frente albúmina y hemoglobina homocisteiniladas predominantemente en pacientes con AR severa y con alta actividad [38], mientras que el segundo la observó frente a la alfa-1-antitripsina

homocisteinilada predominantemente en pacientes con AR seronegativos [31]. La elección de estas proteínas puede parecer extraña pero se justificó de forma particular para cada estudio. En el primero, los autores estaban interesados en analizar si la asociación entre los anticuerpos anti-albúmina y hemoglobina homocisteiniladas que ya habían encontrado presentes en todos los sujetos analizados y elevados en pacientes con otras enfermedades [280,287,288] se observaba también en los pacientes con AR. Este estudio se encuadra en la hipótesis de que los que niveles elevados de homocisteína predisponen a arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares [280,444], aunque el estudio no incluyó análisis de arteriosclerosis o de patología cardiovascular [38]. En el segundo estudio, la alfa-1-antitripsina homocisteinilada fue identificada como una proteína reconocida en el líquido sinovial por el suero de pacientes con AR seronegativos en el marco de la búsqueda de biomarcadores [31]. Como nuestro interés era descubrir anticuerpos con potencial patogénico y de biomarcadores diagnósticos, las proteínas sinoviales nos parecieron más informativas que otros antígenos como ya se ha discutido con anterioridad. Por este motivo, la ausencia de reactividad específica frente a las proteínas sinoviales homocisteiniladas que hemos encontrado pone en duda el significado que los anticuerpos frente a proteínas homocisteiniladas séricas puede tener en la AR. Quizás, los anticuerpos frente a albúmina y hemoglobina homocisteiniladas se puedan interpretar como inespecíficos de la AR ya que se encuentran en varias enfermedades [280,287,288]. Además, no es posible asumir que la discordancia entre los tres estudios se debe al análisis de proteínas diferentes sin más discusión. Esto es así porque hay experimentos que muestran que hay reactividad cruzada entre las tres proteínas homocisteiniladas, albúmina, hemoglobina y alfa-1-antitripsina, además de con otras moléculas N-homocisteiniladas [288]. Estos resultados indican que la reactividad frente al grupo N-homocisteína es relativamente independiente de la proteína sobre la que se encuentra y son similares a los obtenidos con los anticuerpos de la AR frente a sus PTM diana, citrulinación, carbamilación y acetilación [332,333,363]. En esos experimentos, los anticuerpos de la AR reconocen predominantemente la modificación postraduccional, con una especificidad menor por la proteína en la que se han producido. Además, nosotros hemos usado una mezcla de proteínas homocisteiniladas como antígeno, lo que hace todavía más difícil de entender la ausencia de reactividad en nuestros pacientes si todos los resultados mencionados son reproducibles.

Es importante señalar que nuestros pacientes con AR mostraron niveles de anticuerpos anti-Hci-PS significativamente más altos que los controles sanos en el análisis sin corregir. Este es un resultado comparable con los comunicados en los otros dos estudios que no corrigieron sus resultados [31,38], pero que desapareció al sustraer la reactividad inespecífica frente a las proteínas sinoviales nativas. Esta corrección es crítica para establecer la especificidad de los anticuerpos cuando existen anticuerpos a un nivel detectable frente a la proteína nativa y es usada con gran frecuencia (por ejemplo, [32,43,350]. Quizá, la ausencia de un ajuste adecuado de los resultados por la reactividad frente a proteínas nativas haya contribuido a las discordancias. Esto es especialmente probable dado que las diferencias entre pacientes y controles fueron de pequeña magnitud en nuestro estudio (OD mediana antes de corregir 0.160 y 0.145, en pacientes con AR y controles, respectivamente, $p = 0.0001$) y en el estudio de Nowakowska-Plaza *y col*. [38] (OD mediana 0.546 y 0.452, frente a la albúmina homocisteinilada en pacientes con AR y controles, respectivamente) en el que es imposible saber si la reactividad frente a proteínas nativas tuvo algún papel pues no se incluyó ningún control de especificidad [38]. No se comunicó la OD mediana en el estudio de Colasanti *y col*. [31], pero estos autores estudiaron los anticuerpos frente a las dos formas de alfa-1-antitripsina, homocisteinilada y nativa, en paralelo y mostraron los resultados de los dos ensayos aunque

no hicieron una corrección de los niveles [31]. Los pacientes con AR seropositivos y los controles sanos tenían más reactividad frente a la alfa-1-antitripsina nativa que frente a la homocisteinilada, y solo los pacientes con AR seronegativos mostraron más anticuerpos frente a la alfa-1-antitripsina homocisteinilada que frente a la nativa [31]. Incluso este resultado se puede cuestionar pues utilizaron protocolos de ELISA diferentes para determinar los anticuerpos frente a la alfa-1-antitripsina nativa y homocisteinilada. El ELISA para detectar los anticuerpos frente a la proteína nativa utilizó una dilución doble del suero (1/100) y un tiempo de incubación del substrato cuatro veces menor (5 min.) que el ELISA para la proteína homocisteinilada (dilución 1/50, y tiempo 20 min.). Estos cambios tienen el efecto predecible de reducir la sensibilidad del ELISA frente a la proteína nativa y, aunque se describen en los métodos del trabajo, no se justificaron. Por lo tanto, se puede dudar razonablemente de que ninguno de los grupos de pacientes tuviera anticuerpos específicos frente a la alfa-1-antitripsina homocisteinilada y se puede argumentar que si los dos trabajos previos hubiesen corregido apropiadamente los resultados por la reactividad frente a las proteínas sin modificar, sus resultados podrían ser similares a los nuestros.

Pese a lo comentado en relación con los ELISA, hay que considerar si otros aspectos del estudio de Colasanti *y col*. contradicen la interpretación de que no se demostró la especificidad de los anticuerpos. Para ello hay que considerar los experimentos que llevaron a los autores a estudiar la alfa-1-antitripsina. Esta proteína fue identificada como una de las proteínas del líquido sinovial reconocidas por el suero de pacientes con AR [31]. Cuando inmunoprecipitaron la alfa-1 antitripsina del líquido sinovial y la analizaron, descubrieron que estaba homocisteinilada. Pero no se comprobó si los mismos sueros reconocían la alfa-1 antitripsina sin homocisteinilar. Además, la alfa-1 antitripsina inmunoprecipitada del líquido sinovial incluía más PTM: deamidación, carbamilación, carbidometilación y oxidación entre otras [31]. Además, la alfa-1 antitripsina carbamilada se ha identificado como una diana de los anticuerpos anti-CarP en los pacientes con AR [436]. Por lo tanto, los experimentos diferentes de ELISA no despejan las dudas de que se hayan identificado anticuerpos anti-proteínas homocisteiniladas que sean específicos de la PTM en este trabajo.

También es necesario considerar otras posibilidades, pero ninguna parece tener soporte. Por una parte, la homocisteinilación de las proteínas sinoviales se verificó empleando un ensayo inmunoenzimático que está acreditado para su uso clínico y, por lo tanto, con elevado grado de especificidad y exactitud. Por otra, el papel de las diferencias en las características clínicas de los pacientes con AR tampoco parece significativo. Nowakowska-Plaza *y col*. encontraron asociaciones significativas entre la positividad para los anticuerpos anti-Hci en los pacientes con AR y el tiempo de evolución de la enfermedad, el daño radiológico, el número de articulaciones inflamadas, la actividad de la enfermedad y biomarcadores de actividad [38], pero nuestros pacientes tenían un tiempo de evolución dos veces superior al de los pacientes incluidos en el estudio inicial y una fracción importante presentaban erosiones (65.6%), por lo que solo se podría hipotetizar que un mejor control de la actividad de la AR en nuestros pacientes fuese la causa de la ausencia de anticuerpos anti-Hci. En cuanto al estudio de Colasanti *y col*., solo encuentran asociación entre los anticuerpos anti-Hci y los pacientes con AR seronegativos [31], pero nosotros no encontramos ninguna diferencia en los anticuerpos anti-Hci corregidos entre los pacientes seronegativos y seropositivos en nuestros pacientes. Tampoco es probable es que el tabaquismo tenga un efecto en la prevalencia de los anticuerpos anti-Hci ya que no se observó asociación entre el tabaco y la presencia de anticuerpos anti-Hci en los pacientes con AR del trabajo de Nowakowska-Plaza *y col*. [38] y la

frecuencia de fumadores en ese estudio era similar a la presente en nuestros pacientes. Por su parte, el estudio de Colasanti *y col*. [31] no proporciona información sobre la exposición al tabaco.

En conclusión, no se ha encontrado presencia significativa de anticuerpos específicos frente a las modificaciones postraduccionales de carbonilación, nitración y homocisteinilación en los pacientes con AR. La reactividad detectada en el suero de los pacientes no fue atribuible a ninguna de las tres modificaciones postraduccionales evaluadas en vista de la desaparición de reactividad tras la corrección por la señal basal. Por lo tanto, los resultados reflejaron más los niveles variables de reconocimiento de los antígenos no modificados que de las proteínas modificadas. Como estos resultados difieren de los publicados previamente, que no incluyeron las mismas correcciones para establecer la especificidad de los anticuerpos, se necesitan otros estudios independientes para resolver las discrepancias. Si los nuestros se confirman, indicarían que sólo ciertas modificaciones postraduccionales son relevantes en la AR y que la carbonilación, la nitración y la homocisteinilación no se encuentran entre ellas. Esto implicaría además que el repertorio de anticuerpos incluidos en el término AMPA en relación con la AR se encuentra limitado a un número reducido de anticuerpos como los ACPA, los anti-CarP y posiblemente los AAPA a diferencia de lo que se ha propuesto.

Los resultados de esta tesis han contribuido a caracterizar a los anticuerpos anti-cH4/39-40 identificados como inmunodominantes dentro de los ACPA al relacionarlos con el segundo componente genético de riesgo más importante de la AR y con la presencia de erosiones. También han contribuido a ampliar el conocimiento de los anticuerpos atípicos o nuevos frente a modificaciones postraduccionales descritos en la AR, algunos de ellos poco estudiados. Concretamente, se ha mostrado que los anticuerpos anti-AcOrn podrían utilizarse como biomarcadores de diagnóstico en la práctica clínica desde la perspectiva de la concordancia. Por el contrario, los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA, identificados como dos sistemas independientes de anticuerpos, no han mostrado características interesantes para su uso como biomarcadores. Por su parte, los anticuerpos anti-Carbo, anti-Nitra y anti-Hci no se han detectado en los pacientes con AR así como tampoco se han identificado posibles factores que puedan contribuir a un aumento de su reactividad. Sin embargo, es necesario confirmar estos hallazgos en colecciones de pacientes independientes y buscar mecanismos que expliquen algunos de ellos, como la asociación de los anticuerpos anti-cH4/39-40 con el alelo de riesgo *PTPN22* y con la presencia de erosiones. Además, confirmar las mejorías en la clasificación con la triple concordancia incluyendo los anticuerpos anti-AcOrn es un requisito indispensable antes de plantearse la modificación de los criterios de clasificación actuales. Por último, las inconsistencias entre estudios y la incertidumbre que todavía existe en relación con los anticuerpos anti-MAA, anti-MDA, anti-Carbo, anti-Nitra y anti-Hci ponen de manifiesto la alta necesidad de estudios de replicación independientes. La resolución de estas incógnitas ayudará a definir qué reactividades son importantes en la AR y permitirán el avance hacia la búsqueda de nuevos biomarcadores que mejoren el manejo de los pacientes.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Los anticuerpos anti-cH4/39-40 están presentes en una mayoría de los pacientes con anticuerpos anti-CCP, mostrando una frecuencia en el rango máximo de los anticuerpos que reconocen proteínas citrulinadas específicas. Sin embargo, no llegan al nivel de práctica equivalencia con los anti-CCP comunicado previamente.

2. Los anticuerpos anti-cH4/39-40 se asocian con la presencia de erosiones y con la presencia del alelo de riesgo de *PTPN22* en los pacientes con AR, pero no muestran una asociación independiente con los alelos del EC. Estos resultados refuerzan la relevancia de las histonas como autoantígenos en la AR y sugieren un posible papel de los anticuerpos anti-cH4/39-40 en el proceso de pérdida ósea.

3. Los anticuerpos anti-AcOrn presentan un valor inferior al del FR y los anti-CCP para la clasificación de los pacientes con EA, tanto en el total de los pacientes como en el subgrupo de pacientes seronegativos, debido a su menor sensibilidad y a su elevada concordancia con estos dos anticuerpos.

4. Una puntuación basada en la presencia concordante de FR, anti-CCP y anticuerpos anti-AcOrn permite mejorar la clasificación de los pacientes con EA, aumentando la especificidad y la exactitud de la clasificación en comparación con los criterios actuales ACR/EULAR del 2010.

5. Los anticuerpos anti-MAA de los isotipos IgG, IgM e IgA y los anticuerpos anti-MDA de los isotipos IgG e IgM se detectan en los pacientes con AR con una prevalencia inferior al 20%. Esta limitada sensibilidad junto con la falta de especificidad ya conocida cuestionan la utilidad de estos anticuerpos como biomarcadores de la AR.

6. Los anticuerpos anti-MAA y anti-MDA no muestran ni una concordancia en su estado, ni una correlación en sus niveles, superiores a las que se observan entre otros autoanticuerpos de la AR, lo que indica que son dos sistemas de anticuerpos independientes a pesar de que la modificación postraduccional que reconocen se origine en procesos similares.

7. Los anticuerpos anti-MAA y los anti-MDA no muestran resultados consistentes ni asociaciones claras con factores de riesgo o características de la AR, por lo que la asociación de los IgM anti-MAA con el tabaquismo que hemos observado debe considerarse con prudencia aunque ya había sido comunicada en un estudio previo.

8. Los anticuerpos frente a modificaciones postraduccionales que incluyen anticuerpos frente a colágeno tipo II modificado con HOCl, las proteínas sinoviales o péptidos nitrados, y las proteínas sinoviales homocisteiniladas, no muestran reactividad específica en la AR. Solo los anticuerpos anti-colágeno tipo II modificado por ribosa muestran niveles de anticuerpos específicos en los pacientes con AR superiores a los controles, aunque de una magnitud muy modesta. Por lo tanto, no parece probable que ninguno de estos anticuerpos sea relevante en la AR. Estos resultados resaltan la importancia de substraer la reactividad frente a las proteínas sin modificar de la reactividad frente a proteínas modificadas postraduccionalmente para evaluar la especificidad de los anticuerpos.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

1. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **388,** 2023–2038 (2016).
2. Smolen, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4,** 1–23 (2018).
3. Turesson, C. & Jacobsson, L. T. H. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* **33,** 65–73 (2004).
4. Safiri, S. *et al.* Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann. Rheum. Dis.* **78,** 1463–1471 (2019).
5. Peschken, C. A. & Esdaile, J. M. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin. Arthritis Rheum.* **28,** 368–391 (1999).
6. Barnabe, C., Elias, B., Bartlett, J., Roos, L. & Peschken, C. Arthritis in Aboriginal Manitobans: Evidence for a high burden of disease. *J. Rheumatol.* **35,** 1145–1150 (2008).
7. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* **24,** 453–462 (2014).
8. Anderson, M. M., Requena, J. R., Crowley, J. R., Thorpe, S. R. & Heinecke, J. W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N(ε)- (carboxymethyl)lysine on proteins: A mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* **104,** 103–113 (1999).
9. Szabó, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. in *Toxicology Letters* **140-141,** 105–112 (Elsevier Ireland Ltd, 2003).
10. Smallwood, M. J. *et al.* Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **125,** 3–14 (2018).
11. Cedergren, J., Forslund, T., Sundqvist, T. & Skogh, T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J. Rheumatol.* **34,** 2162–2170 (2007).
12. Remans, P. H. J. *et al.* Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52,** 2003–2009 (2005).
13. Kundu, S. *et al.* Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. *Free Radic. Res.* **46,** 1482–1489 (2012).
14. Vasanthi, P., Nalini, G. & Rajasekhar, G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **12,** 29–33 (2009).
15. Veselinovic, M. *et al.* Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: Relationship to diseases activity. *Mol. Cell. Biochem.* **391,** 225–232 (2014).
16. Datta, S. *et al.* Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **33,** 1557–1564 (2014).
17. McInnes, I. B. *et al.* Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.* **184,** 1519–1524 (1996).
18. Farrell, A. J., Blake, D. R., Palmer, R. M. J. & Moncada, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **51,** 1219–1222 (1992).
19. Seven, A., Güzel, S., Aslan, M. & Hamuryudan, V. Lipid, protein, DNA oxidation and

antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* **41,** 538–543 (2008).

20. Stamp, L. K. *et al.* Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* **51,** 1796–1803 (2012).
21. Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A. & Fatima, N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One* **11,** (2016).
22. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* **329,** 23–38 (2003).
23. Hassan, S. Z. *et al.* Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: Relationship to disease manifestations and activity. *Int. J. Rheum. Dis.* **14,** 325–331 (2011).
24. Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R. & Bakan, E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **21,** 200–204 (2002).
25. Kamanli, A., Naziroğlu, M., Aydilek, N. & Hacievliyagil, C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem. Funct.* **22,** 53–57 (2004).
26. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11,** 81–128 (1991).
27. Ryan, B. J., Nissim, A. & Winyard, P. G. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biology* **2,** 715–724 (2014).
28. Sandhu, J. K., Robertson, S., Birnboim, H. C. & Goldstein, R. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **30,** 1173–1181 (2003).
29. Ahmed, U., Anwar, A., Savage, R. S., Thornalley, P. J. & Rabbani, N. Protein oxidation, nitration and glycation biomarkers for early-stage diagnosis of osteoarthritis of the knee and typing and progression of arthritic disease. *Arthritis Res. Ther.* **18,** 250 (2016).
30. Nissim, A. *et al.* Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint. *Arthritis Rheum.* **52,** 3829–3838 (2005).
31. Colasanti, T. *et al.* Homocysteinylated alpha 1 antitrypsin as an antigenic target of autoantibodies in seronegative rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmun.* **113,** (2020).
32. Thiele, G. M. *et al.* Malondialdehyde-acetaldehyde adducts and anti-malondialdehyde-acetaldehyde antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67,** 645–655 (2015).
33. Grönwall, C. *et al.* Autoreactivity to malondialdehyde-modifications in rheumatoid arthritis is linked to disease activity and synovial pathogenesis. *J. Autoimmun.* **84,** 29–45 (2017).
34. Mikuls, T. R. *et al.* Enrichment of malondialdehyde-acetaldehyde antibody in the rheumatoid arthritis joint. *Rheumatology (Oxford).* **56,** 1794–1803 (2017).
35. Khan, F. & Siddiqui, A. A. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus

erythematosus. *Clin. Chim. Acta* **370,** 100–107 (2006).

36. Xie, X. *et al.* Auto-antibodies to post-translationally modified proteins in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **29,** 924–933 (2021).
37. Strollo, R. *et al.* Autoantibodies to posttranslationally modified type II collagen as potential biomarkers for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **65,** 1702–1712 (2013).
38. Nowakowska-Plaza, A., Potaczek, D. P., Gluszko, P. & Undas, A. Antibodies to N-homocysteinylated albumin and haemoglobin in patients with rheumatoid arthritis: A potential new marker of disease severity. *Scand. J. Rheumatol.* **43,** 17–21 (2014).
39. Mikuls, T. R. *et al.* Malondialdehyde–acetaldehyde antibody concentrations in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Int. Immunopharmacol.* **56,** 113–118 (2018).
40. Fonseca, L. J. S. Da, Nunes-Souza, V., Goulart, M. O. F. & Rabelo, L. A. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019,** (2019).
41. Corper, A. L. *et al.* Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. *Nat. Struct. Biol.* **4,** 374–381 (1997).
42. Schellekens, G. A., De Jong, B. A. W., Van Den Hoogen, F. H. J., Van De Putte, L. B. A. & Van Venrooij, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **101,** 273–281 (1998).
43. 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.* **108,** 17372–17377 (2011).
44. Juarez, M. *et al.* Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75,** 1099–1107 (2016).
45. Padyukov, L. *et al.* A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 259–265 (2011).
46. Viatte, S. *et al.* Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Ann. Rheum. Dis.* **71,** 1984–1990 (2012).
47. 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,** 285 (2016).
48. Hedström, A. K., Rönnelid, J., Klareskog, L. & Alfredsson, L. Complex Relationships of Smoking, HLA–DRB1 Genes, and Serologic Profiles in Patients With Early Rheumatoid Arthritis: Update From a Swedish Population-Based Case–Control Study. *Arthritis Rheumatol.* **71,** 1504–1511 (2019).
49. 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,** 291–296 (2012).
50. Han, B. *et al.* Fine mapping seronegative and seropositive rheumatoid arthritis to

USC DE COMPOSTELA

shared and distinct HLA alleles by adjusting for the effects of heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **94,** 522–532 (2014).

51. Holoshitz, J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Current Opinion in Rheumatology* **22,** 293–298 (2010).
52. Huizinga, T. W. J. *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).
53. 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).
54. Ding, B. *et al.* Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum.* **60,** 30–38 (2009).
55. Bossini-Castillo, L. *et al.* A genome-wide association study of rheumatoid arthritis without antibodies against citrullinated peptides. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** e15–e15 (2015).
56. Regueiro, C. *et al.* HLA–B*08 Identified as the Most Prominently Associated Major Histocompatibility Complex Locus for Anti–Carbamylated Protein Antibody–Positive/Anti–Cyclic Citrullinated Peptide–Negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **73,** 963–969 (2021).
57. 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).
58. Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506,** 376–381 (2014).
59. Begovich, A. B. *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).
60. Eyre, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **44,** 1336–1340 (2012).
61. Morgan, A. W. *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).
62. Stanford, S. M. & Bottini, N. PTPN22: The archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nature Reviews Rheumatology* **10,** 602–611 (2014).
63. Bayley, R. *et al.* The autoimmune-associated genetic variant PTPN22 R620W enhances neutrophil activation and function in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** 1588–1595 (2015).
64. Chang, H. H., Dwivedi, N., Nicholas, A. P. & Ho, I. C. The W620 polymorphism in PTPN22 disrupts its interaction with peptidylarginine deiminase type 4 and enhances citrullination and netosis. *Arthritis Rheumatol.* **67,** 2323–2334 (2015).
65. Darrah, E. & Andrade, F. Editorial: Citrullination, and carbamylation, and malondialdehyde-acetaldehyde! oh my! entering the forest of autoantigen modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67,** 604–608 (2015).

66. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-.).* **303,** 1532–1535 (2004).

67. Samuels, J., Ng, Y. S., Coupillaud, C., Paget, D. & Meffre, E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **201,** 1659–1667 (2005).

68. Arechiga, A. F. *et al.* Cutting Edge: The PTPN22 Allelic Variant Associated with Autoimmunity Impairs B Cell Signaling. *J. Immunol.* **182,** 3343–3347 (2009).

69. Rieck, M. *et al.* Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes. *J. Immunol.* **179,** 4704–4710 (2007).

70. Montes, A. *et al.* Anti-Carbamylated Protein Antibodies as a Reproducible Independent Type of Rheumatoid Arthritis Autoantibodies. *PLoS One* **11,** e0161141 (2016).

71. 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).

72. 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).

73. Di Giuseppe, D., Discacciati, A., Orsini, N. & Wolk, A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: A dose-response meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* **16,** (2014).

74. Padyukov, L., Suva, C., Stolt, P., Alfredsson, L. & Klareskog, L. 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).

75. Linn-Rasker, S. P. *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).

76. Regueiro, C. *et al.* A predominant involvement of the triple seropositive patients and others with rheumatoid factor in the association of smoking with rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* **10,** 1–11 (2020).

77. Bongartz, T. *et al.* Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **46,** 70–75 (2007).

78. 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).

79. Demoruelle, M. K. *et al.* Brief report: airways abnormalities and rheumatoid arthritis-related autoantibodies in subjects without arthritis: Early injury or initiating site of autoimmunity? *Arthritis Rheum.* **64,** 1756–1761 (2012).

80. 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).

81. 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).

82. Willis, V. C. *et al.* Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. *Arthritis Rheum.* **65,** 2545–2554 (2013).

83. Klareskog, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* **54,** 38–46 (2006).

84. Wang, Z. *et al.* Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat. Med.* **13,** 1176–1184 (2007).
85. Pang, X. & Lewis, A. C. Carbonyl compounds in gas and particle phases of mainstream cigarette smoke. *Sci. Total Environ.* (2011). doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.065
86. Fujioka, K. & Shibamoto, T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ. Toxicol.* **21,** 47–54 (2006).
87. Freeman, T. L. *et al.* Aldehydes in cigarette smoke react with the lipid peroxidation product malonaldehyde to form fluorescent protein adducts on lysines. *Chem. Res. Toxicol.* **18,** 817–824 (2005).
88. Kalra, J., Chaudhary, A. K. & Prasad, K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int. J. Exp. Pathol.* **72,** 1–7 (1991).
89. Holers, V. M. *et al.* Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. *Nature Reviews Rheumatology* **14,** 542–557 (2018).
90. Gan, R. W. *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).
91. Sokolove, J. *et al.* Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7,** e35296 (2012).
92. MacPherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* **1,** 11–22 (2008).
93. Kokkonen, H. *et al.* Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13,** (2011).
94. 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).
95. Mikuls, T. R., Payne, J. B., Deane, K. D. & Thiele, G. M. Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis? *J. Allergy Clin. Immunol.* **137,** 28–34 (2016).
96. England, B. R. *et al.* Malondialdehyde–Acetaldehyde Adducts and Antibody Responses in Rheumatoid Arthritis–Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* **71,** 1483–1493 (2019).
97. Bonfil, J. J. *et al.* A 'case control' study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis: Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR.SSO). *J. Clin. Periodontol.* **26,** 77–84 (1999).
98. Katz, J., Goultschin, J., Benoliel, R. & Brautban, C. Human leukocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressing periodontitis. *J. Periodontol.* **58,** 607–610 (1987).
99. Tomar, S. L. & Asma, S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Periodontol.* **71,** 743–751 (2000).
100. Eriksson, K. *et al.* Prevalence of periodontitis in patients with established rheumatoid

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

arthritis: A swedish population based case-control study. *PLoS One* **11,** e0155956 (2016).

101. Harvey, G. P. *et al.* Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J. Periodontal Res.* **48,** 252–261 (2013).
102. Lappin, D. F. *et al.* Influence of periodontal disease, Porphyromonas gingivalis and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. *J. Clin. Periodontol.* **40,** 907–915 (2013).
103. Mikuls, T. R. *et al.* Periodontitis and porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66,** 1090–1100 (2014).
104. McGraw, W. T., Potempa, J., Farley, D. & Travis, J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from Porphyromonas gingivalis, peptidylarginine deiminase. *Infect. Immun.* **67,** 3248–3256 (1999).
105. Konig, M. F. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **8,** (2016).
106. Rosenstein, E. D., Greenwald, R. A., Kushner, L. J. & Weissmann, G. Hypothesis: The humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* **28,** 311–318 (2004).
107. Bright, R. *et al.* Gingival tissue, an extrasynovial source of malondialdehyde-acetaldehyde adducts, citrullinated and carbamylated proteins. *J. Periodontal Res.* **53,** 139–143 (2018).
108. Nesse, W. *et al.* The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J. Clin. Periodontol.* **39,** 599–607 (2012).
109. Vitkov, L., Klappacher, M., Hannig, M. & Krautgartner, W. D. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J. Periodontal Res.* **44,** 664–672 (2009).
110. Gómez-Bañuelos, E., Mukherjee, A., Darrah, E. & Andrade, F. Rheumatoid arthritis-associated mechanisms of porphyromonas gingivalis and aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Journal of Clinical Medicine* **8,** 1309 (2019).
111. Zhang, X. *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* **21,** 895–905 (2015).
112. Chen, J. *et al.* An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* **8,** (2016).
113. Maeda, Y. *et al.* Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* **68,** 2646–2661 (2016).
114. Scher, J. U. *et al.* Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife* **2013,** (2013).
115. Hooper, L. V. & MacPherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* **10,** 159–169 (2010).
116. Xu, H. *et al.* The Dynamic Interplay between the Gut Microbiota and Autoimmune Diseases. *J. Immunol. Res.* **2019,** 7546047 (2019).
117. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17,** 219–232 (2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

118. Gerlag, D. M. *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. *Annals of the Rheumatic Diseases* **71,** 638–641 (2012).
119. Nielen, M. M. J. *et al.* Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis Rheum.* **50,** 380–386 (2004).
120. Van Steenbergen, H. W. *et al.* Characterising arthralgia in the preclinical phase of rheumatoid arthritis using MRI. *Ann. Rheum. Dis.* **74,** 1225–1232 (2015).
121. Kraan, M. C. *et al. A symptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis*. *Arthritis and Rheumatism* **41,** (1998).
122. Orozco, G. *et al.* Auto-antibodies, HLA and PTPN22: susceptibility markers for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47,** 138–141 (2008).
123. González-Álvaro, 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).
124. Schumacher, H. R., Habre, W., Meador, R. & Hsia, E. C. Predictive Factors in Early Arthritis: Long-Term Follow-up. *Semin. Arthritis Rheum.* **33,** 264–272 (2004).
125. Quinn, M. A. *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).
126. Symmons, D. P. M. & Silman, A. J. Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Research and Therapy* **8,** 1–6 (2006).
127. van Aken, J., van Bilsen, J., Allaart, C., Huizinga, T. & Breedveld, F. The Leiden Early Arthritis Clinic. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21,** S100–5 (2003).
128. 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).
129. Singh, J. A. *et al.* 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken).* **68,** 1–25 (2016).
130. de Moel, E. C. *et al.* Baseline autoantibody profile in rheumatoid arthritis is associated with early treatment response but not long-term outcomes. *Arthritis Res. Ther.* **20,** 33 (2018).
131. Yiannopoulos, G., Daoussis, D., Melissaropoulos, K., Tsouni, C. & Andonopoulos, A. P. Evolution of undifferentiated arthritis: A ten-year experience from the early arthritis clinic of a tertiary care hospital. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33,** 341–346 (2015).
132. Hua, C., Daien, C. I., Combe, B. & Landewe, R. 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,** (2017).
133. Aggarwal, R. *et al.* Distinctions between diagnostic and classification criteria? *Arthritis Care and Research* **67,** 891–897 (2015).
134. Van De Sande, M. G. H. *et al.* Different stages of rheumatoid arthritis: Features of the synovium in the preclinical phase. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 772–777 (2011).

135. Ioan-Facsinay, A. *et al.* Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum.* **58,** 3000–3008 (2008).

136. Shi, J. *et al.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73,** 780–783 (2014).

137. 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,** (2015).

138. Bos, W. H. *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).

139. ten Brinck, R. M. *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).

140. Mjaavatten, M. D. *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 early undifferentiated arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12,** 76 (2010).

141. Shi, J. *et al.* The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17,** (2015).

142. Truchetet, M. E. *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).

143. 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).

144. 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).

145. Van De Stadt, L. A. *et al.* Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **63,** 3226–3233 (2011).

146. Mikuls, T. R. *et al.* Autoantibodies to Malondialdehyde–Acetaldehyde Are Detected Prior to Rheumatoid Arthritis Diagnosis and After Other Disease Specific Autoantibodies. *Arthritis Rheumatol.* **72,** 2025–2029 (2020).

147. Scott, D. L. *et al.* The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **39,** 122–132 (2000).

148. Heinlen, L. & Humphrey, M. B. Skeletal complications of rheumatoid arthritis. *Osteoporosis International* **28,** 2801–2812 (2017).

149. Schett, G. & Gravallese, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Rheumatology* **8,** 656–664 (2012).

150. Güler-Yüksel, M. *et al.* Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** (2009).

151. Mangnus, L., van Steenbergen, H. W., Reijnierse, M., Kälvesten, J. & van der Helm-Van Mil, A. H. M. Bone mineral density loss in clinically suspect arthralgia is

associated with subclinical inflammation and progression to clinical arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **46,** (2017).

152. Kleyer, A. & Schett, G. Arthritis and bone loss: A hen and egg story. *Current Opinion in Rheumatology* **26,** (2014).
153. Harre, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **122,** 1791–1802 (2012).
154. Krishnamurthy, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying Rheumatoid arthritisassociated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* **75,** 721–729 (2016).
155. Engdahl, C. *et al.* Periarticular Bone Loss in Arthritis Is Induced by Autoantibodies Against Citrullinated Vimentin. *J. Bone Miner. Res.* **32,** 1681–1691 (2017).
156. Harre, U. *et al.* Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat. Commun.* **6,** (2015).
157. 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).
158. Sokolove, J. *et al.* Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66,** 813–821 (2014).
159. Combe, B. *et al.* 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76,** 948–959 (2017).
160. Monti, S., Montecucco, C., Bugatti, S. & Caporali, R. Rheumatoid arthritis treatment: The earlier the better to prevent joint damage. *RMD Open* **1,** (2015).
161. Van Nies, J. A. B. *et al.* What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases* **73,** 861–870 (2014).
162. Arnett, F. C. *et al.* The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31,** 315–324 (1988).
163. Neogi, T. *et al.* The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum.* **62,** 2582–2591 (2010).
164. Funovits, J. *et al.* The 2010 American College of Rheumatology/European league against rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Methodological report phase I. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 1589–1595 (2010).
165. 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).
166. 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).
167. Gaalen, F. A. van *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).
168. Van Der Helm-van Mil, A. H. M. & Huizinga, T. W. J. The 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis: Do they affect the classification or diagnosis of rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases* **71,** 1596–1598 (2012).

169. Radner, H., Neogi, T., Smolen, J. S. & Aletaha, D. Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **73,** 114–123 (2014).

170. Van Der Helm-Van Mil, A. H. M. & Zink, A. What is rheumatoid arthritis? Considering consequences of changed classification criteria. *Annals of the Rheumatic Diseases* **76,** 315–317 (2017).

171. Boeters, D. M., Gaujoux-Viala, C., Constantin, A. & van der Helm-van Mil, A. H. M. The 2010 ACR/EULAR criteria are not sufficiently accurate in the early identification of autoantibody-negative rheumatoid arthritis: Results from the Leiden-EAC and ESPOIR cohorts. *Semin. Arthritis Rheum.* **47,** 170–174 (2017).

172. M, van der V. *et al.* Do we need to lower the cut point of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for diagnosing rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford).* **55,** 636–639 (2016).

173. Nordberg, L. B. *et al.* Patients with seronegative RA have more inflammatory activity compared with patients with seropositive RA in an inception cohort of DMARD-naïve patients classified according to the 2010 ACR/EULAR criteria. *Ann. Rheum. Dis.* **76,** 341–345 (2017).

174. Kaneko, Y., Kuwana, M., Kameda, H. & Takeuchi, T. Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology* **50,** 1268–1274 (2011).

175. Trouw, L. A. & Mahler, M. Closing the serological gap: Promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* **12,** 318–322 (2012).

176. Regueiro, C. *et al.* Value of measuring anti-carbamylated protein antibodies for classification on early arthritis patients. *Sci. Rep.* **7,** 12023 (2017).

177. Boeters, D. M., Trouw, L. A., van der Helm-van Mil, A. H. M. & van Steenbergen, H. W. 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,** 94 (2018).

178. Studenic, P. *et al.* The Diagnostic and Predictive Value of Anti-Acetylated Peptide Antibodies (AAPA) in Rheumatoid Arthritis Patients Starting Their First Dmard Treatment on Methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* **75,** 694 (2016).

179. Studenic, P. *et al.* Prevalence of anti-acetylated protein antibodies in inflammatory arthritis, osteoarthritis, connective tissue diseases and its discriminative capacity as diagnostic marker for early rheumatoid arthritis. in *Annals of the Rheumatic Diseases* **77,** 816–817 (BMJ, 2018).

180. Verheul, M. K. *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).

181. Regueiro, C. *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. Ther.* **21,** 280 (2019).

182. Van Dijk, B. T., Trouw, L. A., Van Der Helm-Van Mil, A. H. M. & Huizinga, T. W. J. Substitution of the quantitative serological component in the 2010 criteria for RA with qualitative presence of three autoantibodies yields similar performance: response to the

article by Regueiro et al. *Arthritis Research and Therapy* **22,** 85 (2020).

183. Van Der Linden, M. P. M. *et al.* Toward a data-driven evaluation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for rheumatoid arthritis: Is it sensible to look at levels of rheumatoid factor? *Arthritis Rheum.* **63,** 1190–1199 (2011).
184. Smolen, J. S. *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: Recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* **69,** 631–637 (2010).
185. Quinn, M. A. & Emery, P. Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: Possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21,** (2003).
186. Nell, V. P. K. *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).
187. 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).
188. M, K. *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. Smolen, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* **79,** S685–S699 (2020).
190. van Riel, P. L. C. M. 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).
191. van Riel, P. L. C. M. & Renskers, L. 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).
192. Felson, D. T. *et al.* American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 404–413 (2011).
193. Bruce, B. & Fries, J. F. The Stanford Health Assessment Questionnaire: Dimensions and practical applications. *Health Qual. Life Outcomes* **1,** 1–6 (2003).
194. J, F. & PL, van R. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **35,** 745–757 (2009).
195. Smolen, J. S. *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).
196. Ramiro, S. *et al.* Safety of synthetic and biological DMARDs: A systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76,** 1093–1101 (2017).
197. Quinn, M. A. *et al.* Anti-CCP antibodies measured at disease onset help identify seronegative rheumatoid arthritis and predict radiological and functional outcome. *Rheumatology* **45,** 478–480 (2006).
198. De Rycke, L. *et al.* Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in

rheumatoid arthritis: Diagnosis value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann. Rheum. Dis.* **63,** 1587–1593 (2004).

199. Shidara, K. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibody predicts functional disability in patients with rheumatoid arthritis in a large prospective observational cohort in Japan. *Rheumatol. Int.* **32,** 361–366 (2012).
200. Katchamart, W., Koolvisoot, A., Aromdee, E., Chiowchanwesawakit, P. & Muengchan, C. Associations of rheumatoid factor and anti-citrullinated peptide antibody with disease progression and treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **35,** 1693–1699 (2015).
201. Humphreys, J. H. *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. *Ann. Rheum. Dis.* **75,** 1139–1144 (2016).
202. Regueiro, C. *et al.* Increased disease activity in early arthritis patients with anti-carbamylated protein antibodies. *Sci. Rep.* **11,** 9945 (2021).
203. Derksen, V. F. A. 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).
204. Grönwall, C. *et al.* A Comprehensive Evaluation of the Relationship Between Different IgG and IgA Anti-Modified Protein Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **12,** (2021).
205. Trouw, L. A., Rispens, T. & Toes, R. E. M. Beyond citrullination: Other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **13,** 331–339 (2017).
206. Swedler, W., Wallman, J., Froelich, C. J. & Teodorescu, M. Routine measurement of IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors: high sensitivity, specificity, and predictive value for rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* **24,** 1037–1044 (1997).
207. Ingegnoli, F., Castelli, R. & Gualtierotti, R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. **35,** 727–734 (2013).
208. Vossenaar, E. R., Zendman, A. J. W., Van Venrooij, W. J. & Pruijn, G. J. M. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease. *BioEssays* **25,** 1106–1118 (2003).
209. Willemze, A. *et al.* The ACPA recognition profile and subgrouping of ACPA-positive RA patients. *Ann. Rheum. Dis.* **71,** 268–274 (2012).
210. Ioan-Facsinay, A. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 188–193 (2011).
211. Snir, O. *et al.* Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: Association with HLA-DRB1 alleles. *Ann. Rheum. Dis.* **68,** 736–743 (2009).
212. Masson-Bessière, C. *et al.* The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of the α- and β-Chains of Fibrin. *J. Immunol.* **166,** 4177–4184 (2001).
213. Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6,** R142–150 (2004).

214. Kinloch, A. *et al.* Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7,** R1421 (2005).
215. Van Beers, J. J. B. C. *et al.* The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β-actin. *Arthritis Rheum.* **65,** 69–80 (2013).
216. Sohrabian, A. *et al.* Number of individual ACPA reactivities in synovial fluid immune complexes, but not serum anti-CCP2 levels, associate with inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **77,** 1345–1353 (2018).
217. Meng, X. *et al.* Characterization of autoantigens targeted by anti-citrullinated protein antibodies in vivo: Prominent role for epitopes derived from histone 4 proteins. *PLoS One* **11,** e0165501 (2016).
218. Romero, V. *et al.* Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5,** 209ra150–209ra150 (2013).
219. Corsiero, E. *et al.* Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* **75,** 1866–1875 (2016).
220. Johansson, L. *et al.* Antibodies directed against endogenous and exogenous citrullinated antigens pre-date the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18,** (2016).
221. Pratesi, F. *et al.* Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* **73,** 1414–1422 (2014).
222. Janssen, K. M. J. *et al.* Autoantibodies against citrullinated histone H3 in rheumatoid arthritis and periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* **44,** 577–584 (2017).
223. Sohn, D. H. *et al.* Local joint inflammation and histone citrullination in a murine model of the transition from preclinical autoimmunity to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67,** 2877–2887 (2015).
224. Cornillet, M. *et al.* The fibrin-derived citrullinated peptide β60-74Cit60,72,74 bears the major ACPA epitope recognised by the rheumatoid arthritis-specific anticitrullinated fibrinogen autoantibodies and anti-CCP2 antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73,** 1246–1252 (2014).
225. Snir, O. *et al.* Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **62,** 44–52 (2010).
226. Verheul, M. K. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients of asian descent. *Rheumatology (United Kingdom)* **54,** 1930–1932 (2015).
227. 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).
228. Li, L. *et al.* Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-carbamylated protein antibody for rheumatoid arthritis. *PLoS One* **11,** (2016).
229. Jaisson, S., Pietrement, C. & Gillery, P. Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. *Adv. Clin. Chem.* **84,** 1–38 (2018).
230. Claxton, J. S. *et al.* Endogenous carbamylation of renal medullary proteins. *PLoS One*

8, (2013).

231. Kollipara, L. & Zahedi, R. P. Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact? *Proteomics* **13,** 941–944 (2013).
232. Long, J., Vela Parada, X. & Kalim, S. Protein Carbamylation in Chronic Kidney Disease and Dialysis. *Adv. Clin. Chem.* **87,** 37–67 (2018).
233. Lac, P., Racapé, M., Barra, L., Bell, D. A. & Cairns, E. Relatedness of antibodies to peptides containing homocitrulline or citrulline in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **45,** 302–309 (2018).
234. Shi, J. *et al.* Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: Specificity, cross-reactivity and the 'AMC-Senshu' method. *Annals of the Rheumatic Diseases* **72,** 148–150 (2013).
235. Figueiredo, C. P. *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).
236. MA, G., N, S., X, Z. & E, S. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363,** 15–23 (2005).
237. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Widespread and enzyme-independent Nε-acetylation and Nε-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **288,** 29036–29045 (2013).
238. Tuma, D. J., Thiele, G. M., Xu, D., Klassen, L. W. & Sorrell, M. F. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* **23,** 872–880 (1996).
239. Ohya, T. Formation of a New 1,1,1 Adduct in the Reaction of Malondialdehyde, n-Hexylamine and Alkanal under Neutral Conditions. *Biol. Pharm. Bull.* **16,** 137–141 (1993).
240. Xu, D. *et al.* Epitope characterization of malondialdehyde-acetaldehyde adducts using an enzyme-Linked immunosorbent assay. *Chem. Res. Toxicol.* **10,** 978–986 (1997).
241. Kearley, M. L., Patel, A., Chien, J. & Tuma, D. J. Observation of a new nonfluorescent malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct by 13C NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **12,** 100–5 (1999).
242. Guéraud, F. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **44,** 1098–1124 (2010).
243. Uchida, K. Lipofuscin-like fluorophores originated from malondialdehyde. *Free Radical Research* **40,** 1335–1338 (2006).
244. Stolt, P. *et al.* Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: Results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann. Rheum. Dis.* **62,** 835–841 (2003).
245. Anderson, D. R. *et al.* Unique antibody responses to malondialdehyde-acetaldehyde (MAA)-protein adducts predict coronary artery disease. *PLoS One* **9,** e107440 (2014).
246. Duryee, M. J. *et al.* Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **49,** 1480–1486 (2010).
247. Hill, G. E. *et al.* Association of malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury. *Atherosclerosis*

141, 107–116 (1998).

248. Akhi, R. *et al.* Salivary IgA to MAA-LDL and Oral Pathogens Are Linked to Coronary Disease. *J. Dent. Res.* **98,** 296–303 (2019).
249. Tuma, D. J. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic. Biol. Med.* **32,** 303–308 (2002).
250. Rolla, R. *et al.* Detection of circulating antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **31,** 878–84 (2000).
251. Wyatt, T. A. *et al.* Malondialdehyde-acetaldehyde-adducted protein inhalation causes lung injury. *Alcohol* **46,** 51–59 (2012).
252. McCaskill, M. L. *et al.* Hybrid malondialdehyde and acetaldehyde protein adducts form in the lungs of mice exposed to alcohol and cigarette smoke. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **35,** 1106–1113 (2011).
253. Sapkota, M. *et al.* Malondialdehyde–Acetaldehyde (MAA) Protein Adducts Are Found Exclusively in the Lungs of Smokers with Alcohol Use Disorders and Are Associated with Systemic Anti-MAA Antibodies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **41,** 2093–2099 (2017).
254. Vehkala, L. *et al.* Plasma IgA antibody levels to malondialdehyde acetaldehyde-adducts are associated with inflammatory mediators, obesity and type 2 diabetes. *Ann. Med.* **45,** 501–510 (2013).
255. Uchida, K., Sakai, K., Itakura, K., Osawa, T. & Toyokuni, S. Protein modification by lipid peroxidation products: Formation of malondialdehyde-derived N(ε)(2-propenal)lysine in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **346,** 45–52 (1997).
256. Slatter, D. A., Avery, N. C. & Bailey, A. J. Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **279,** 61–69 (2004).
257. Wang, C. *et al.* Natural antibodies of newborns recognize oxidative stress-related malondialdehyde acetaldehyde adducts on apoptotic cells and atherosclerotic plaques. *Int. Immunol.* **25,** 575–587 (2013).
258. Hardt, U. *et al.* Autoimmune reactivity to malondialdehyde adducts in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity and nephritis. *Arthritis Res. Ther.* **20,** 36 (2018).
259. Grönwall, C. *et al.* Depressed serum IgM levels in SLE are restricted to defined subgroups. *Clin. Immunol.* **183,** 304–315 (2017).
260. Grönwall, C. *et al.* IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin. Immunol.* **142,** 390–398 (2012).
261. Thiagarajan, D. *et al.* IgM antibodies against malondialdehyde and phosphorylcholine in different systemic rheumatic diseases. *Sci. Rep.* **10,** 1–13 (2020).
262. Kirkham, P. A. *et al.* Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184,** 796–802 (2011).
263. Fedorova, M. Diversity of Protein Carbonylation Pathways: Direct Oxidation, Glycoxidation, and Modifications by Lipid Peroxidation Products. *Protein Carbonylation Princ. Anal. Biol. Implic.* 48–82 (2017). doi:10.1002/9781119374947.ch3

264. Henning, C. & Glomb, M. A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconjugate Journal* **33,** 499–512 (2016).

265. Pattison, D. I. & Davies, M. J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem. Res. Toxicol.* **14,** 1453–1464 (2001).

266. Ulrich, P. & Cerami, A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* **56,** 1–21 (2001).

267. Hawkins, C. L. & Davies, M. J. Hypochlorite-induced damage to proteins: Formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.* **332,** 617–625 (1998).

268. Alouffi, S., Sherwani, S., Al-Mogbel, M. S., Sherwani, M. K. A. & Khan, M. W. A. Depression and Smoking Augment the Production of Circulating Autoantibodies against Glycated HSA in Rheumatoid Arthritis Patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **177,** 170–180 (2018).

269. Ligier, S., Fortin, P. R. & Newkirk, M. M. A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycated IgG: IgM anti-IgG-AGE. *Br. J. Rheumatol.* **37,** 1307–1314 (1998).

270. Newkirk, M. M. *et al.* Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res. Ther.* **5,** 1–9 (2003).

271. Newkirk, M. M., LePage, K., Niwa, T. & Rubin, L. Advanced glycation endproducts (AGE) on IgG, a target for circulating antibodies in North American Indians with rheumatoid arthritis (RA). *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* **44,** 1129–1138 (1998).

272. Lucey, M. D., Newkirk, M. M., Neville, C., Lepage, K. & Fortin, P. R. Association between IgM response to IgG damaged by glyoxidation and disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **27,** 319–323 (2000).

273. Van der Vliet, A. *et al.* Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.* **303,** 295–301 (1994).

274. Ischiropoulos, H. & Al-Mehdi, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* **364,** 279–282 (1995).

275. Khan, M. A., Dixit, K., Uddin, M., Malik, A. & Alam, K. Role of peroxynitrite-modified H2A histone in the induction and progression of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **41,** 426–433 (2012).

276. Dixit, K., Khan, M. A., Sharma, Y. D., Moinuddin & Alam, K. Peroxynitrite-induced modification of H2A histone presents epitopes which are strongly bound by human anti-DNA autoantibodies: Role of peroxynitrite-modified-H2A in SLE induction and progression. *Hum. Immunol.* **72,** 219–225 (2011).

277. Khan, M. A., Dixit, K., Moinuddin, Arif, Z. & Alam, K. Studies on peroxynitrite-modified H1 histone: Implications in systemic lupus erythematosus. *Biochimie* **97,** 104–113 (2014).

278. Thomson, L. *et al.* Immunoglobulins against tyrosine-nitrated epitopes in coronary artery disease. *Circulation* **126,** 2392–2401 (2012).

279. Thomson, L. *et al.* Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36,** 152–157 (2007).

280. Jakubowski, H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiol. Rev.* **99,** 555–604 (2019).
281. Jakubowski, H. Quality control in tRNA charging - editing of homocysteine. *Acta Biochim. Pol.* **58,** 149–163 (2011).
282. Finkelstein, J. D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin. Thromb. Hemost.* **26,** 219–225 (2000).
283. Rasmussen, K. & Moller, J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann. Clin. Biochem.* **37,** 627–648 (2000).
284. Padjas, A., Undas, A., Swadźba, J. & Musiał, J. Antibodies to N-homocysteinylated albumin in patients with systemic lupus erythematosus. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **117,** 20–25 (2007).
285. Undas, A. *et al.* Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in patients on long-term haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22,** 1685–1689 (2007).
286. Kolarz, M. *et al.* Antibodies against N-homocysteinylated proteins and their determinants in patients on long-term hemodialysis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **120,** 223–230 (2010).
287. Undas, A. *et al.* Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb. Haemost.* **93,** 346–350 (2005).
288. Undas, A. *et al.* Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: Implications for atherosclerosis. *Stroke* **35,** 1299–1304 (2004).
289. Lundberg, K. *et al.* Antibodies to citrullinated α-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* **58,** 3009–3019 (2008).
290. Verpoort, K. N. *et al.* Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum.* **56,** 3949–3952 (2007).
291. Montes, A., Perez-Pampin, E., Calaza, M., Gomez-Reino, J. J. & Gonzalez, A. Association of anti-citrullinated vimentin and anti-citrullinated α-enolase antibodies with subsets of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64,** 3102–3110 (2012).
292. Bang, H. *et al.* Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56,** 2503–2511 (2007).
293. Kikugawa, K. & Ido, Y. Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* **19,** 600–608 (1984).
294. Thiele, G. M., Klassen, L. W. & Tuma, D. J. Formation and immunological properties of aldehyde-derived protein adducts following alcohol consumption. *Methods Mol. Biol.* **447,** 235–257 (2008).
295. Hawkins, C. L., Brown, B. E. & Davies, M. J. Hypochlorite-and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **395,** 137–145 (2001).
296. Morris, J. C. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.* **70,** 3798–3805 (1966).
297. Hussain, A., Trudell, P. & Repta, A. J. Quantitative Spectrophotometric Methods for Determination of Sodium Hypochlorite in Aqueous Solutions. *J. Pharm. Sci.* **59,** 1168–1170 (1970).

298. Xu, Y. *et al.* iNitro-Tyr: Prediction of nitrotyrosine sites in proteins with general pseudo amino acid composition. *PLoS One* **9,** e105018 (2014).

299. Liu, Z. *et al.* GPS-YNO2: Computational prediction of tyrosine nitration sites in proteins. *Mol. Biosyst.* **7,** 1197–1204 (2011).

300. El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. & Honavar, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.* **21,** 243–255 (2008).

301. Uversky, V. N. *et al.* Effects of nitration on the structure and aggregation of α-synuclein. *Mol. Brain Res.* **134,** 84–102 (2005).

302. Frantzen, F., Faaren, A. L., Alfheim, I. & Nordhei, A. K. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin. Chem.* **44,** 311–316 (1998).

303. Gorinstein, S. *et al.* Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J. Protein Chem.* **19,** 637–42 (2000).

304. Andreea, S. I., Marieta, C. & Anca, D. AGEs and glucose levels modulate type I and III procollagen mRNA synthesis in dermal fibroblasts cells culture. *Exp. Diabetes Res.* **2008,** 473603 (2008).

305. Yanagisawa, K. *et al.* Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism.* **47,** 1348–1353 (1998).

306. Scharf, B. *et al.* Age-related carbonylation of fibrocartilage structural proteins drives tissue degenerative modification. *Chem. Biol.* **20,** 922–934 (2013).

307. Dinda, A. K., Tripathy, D. R. & Dasgupta, S. Glycation of Ribonuclease A affects its enzymatic activity and DNA binding ability. *Biochimie* **118,** 162–172 (2015).

308. Biemel, K. M., Reihl, O., Conrad, J. & Lederer, M. O. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by maillard processes: Unraveling the structure of a pentosidine precursor. *J. Biol. Chem.* **276,** 23405–23412 (2001).

309. Khan, M. A., Arif, Z., Moinuddin & Alam, K. Characterization of methylglyoxal-modified human igg by physicochemical methods. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36,** 3172–3183 (2018).

310. Witko-Sarsat, V. *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* **49,** 1304–1313 (1996).

311. Bailey, A. J., Sims, T. J., Avery, N. C. & Halligan, E. P. Non-enzymic glycation of fibrous collagen: Reaction produces of glucose and ribose. *Biochem. J.* **305,** 385–390 (1995).

312. Raghav, A., Ahmad, J. & Alam, K. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. *PLoS One* **12,** e0176970 (2017).

313. Jairajpuri, D. S., Fatima, S. & Saleemuddin, M. Immunoglobulin glycation with fructose: A comparative study. *Clin. Chim. Acta* **378,** 86–92 (2007).

314. Levine, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186,** 464–78 (1990).

315. Soglia, F., Petracci, M. & Ertbjerg, P. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food Chem.* **197,** 670–675 (2016).

316. Sadowska-Bartosz, I. *et al.* Oxidative modification of serum proteins in multiple

sclerosis. *Neurochem. Int.* **63,** 507–516 (2013).

317. Montes, A. *et al.* Particular association of clinical and genetic features with autoimmunity to citrullinated α-enolase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **63,** 654–661 (2011).
318. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One* **10,** e0146021 (2015).
319. Burnham, K. P. & Anderson, D. R. *Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach*. (New York: Springer-Verlag, 2004).
320. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2008).
321. Love, J., Dropmann, D. & Selker, R. The jamovi project. (2019).
322. Vidal-Bralo, L. *et al.* Anti-carbamylated protein autoantibodies associated with mortality in Spanish rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* **12,** e0180144 (2017).
323. Terao, C. *et al.* Distinct HLA Associations with Rheumatoid Arthritis Subsets Defined by Serological Subphenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **105,** 616–624 (2019).
324. Willemze, A. *et al.* The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens. *Arthritis Rheum.* **63,** 1823–1832 (2011).
325. Rönnelid, J. *et al.* Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPApositive rheumatoid arthritis patients with distinct genetic and environmental determinants. *Ann. Rheum. Dis.* **77,** 203–211 (2018).
326. Mlynárik, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry* **529,** 4–9 (2017).
327. Shahab, U. *et al.* Hydroxyl radical modification of collagen type II increases its arthritogenicity and immunogenicity. *PLoS One* **7,** e31199 (2012).
328. Hodge, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1,** 928–943 (1953).
329. Eyre, D. R., Weis, M. A. & Wu, J.-J. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* **45,** 65–74 (2008).
330. Fujimori, E. Cross-linking and fluorescence changes of collagen by glycation and oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **998,** 105–110 (1989).
331. Dejaco, C. *et al.* Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8,** (2006).
332. 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).
333. Sahlström, P. *et al.* Different Hierarchies of Anti–Modified Protein Autoantibody Reactivities in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **72,** 1643–1657 (2020).
334. Vos, I. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays. *Clin. Rheumatol.* **36,** 1487–1492 (2017).
335. Enriconi dos Anjos, L. M. *et al.* A comparative study of IgG second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs and their combination with

IgA third-generation CCP ELISA for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **28,** 153–158 (2009).

336. Debaugnies, F. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: A comparison of different assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **42,** 108–114 (2013).
337. Dixit, C. K. *et al.* Development of a high sensitivity rapid sandwich ELISA procedure and its comparison with the conventional approach. *Anal. Chem.* **82,** 7049–7052 (2010).
338. Dixit, C. K., Vashist, S. K., MacCraith, B. D. & O'Kennedy, R. Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. *Nat. Protoc.* **6,** 439–445 (2011).
339. Makrygiannakis, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* **67,** 1488–1492 (2008).
340. Lundberg, K. *et al.* Genetic and environmental determinants for disease risk in subsets of rheumatoid arthritis defined by the anticitrullinated protein/peptide antibody fine specificity profile. *Ann. Rheum. Dis.* **72,** 652–658 (2013).
341. Schwenzer, A. *et al.* Association of Distinct Fine Specificities of Anti−Citrullinated Peptide Antibodies With Elevated Immune Responses to Prevotella intermedia in a Subgroup of Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Arthritis Rheumatol.* **69,** 2303–2313 (2017).
342. Mahdi, H. *et al.* Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated α-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **41,** 1319–1324 (2009).
343. Kim, K. Massive false-positive gene-gene interactions by Rothman's additive model. *Ann. Rheum. Dis.* **78,** 437–439 (2018).
344. Menard, L. *et al.* The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *J. Clin. Invest.* **121,** 3635–3644 (2011).
345. Vang, T., Nielsen, J. & Burn, G. L. A switch-variant model integrates the functions of an autoimmune variant of the phosphatase PTPN22. *Science Signaling* **11,** (2018).
346. Armitage, L. H., Wallet, M. A. & Mathews, C. E. Influence of PTPN22 Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* **12,** 189 (2021).
347. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. *PLoS Pathog.* **5,** (2009).
348. Nakashima, K., Hagiwara, T. & Yamada, M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem.* **277,** 49562–49568 (2002).
349. Boire, G. *et al.* Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic citrullinated peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7,** (2005).
350. Scherer, H. U. *et al.* Distinct ACPA fine specificities, formed under the influence of HLA shared epitope alleles, have no effect on radiographic joint damage in rheumatoid

arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 1461–1464 (2011).

351. Fisher, B. A. *et al.* Antibodies to citrullinated α-enolase peptide 1 and clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 1095–1098 (2011).
352. Boman, A. *et al.* Antibodies against citrullinated peptides are associated with clinical and radiological outcomes in patients with early rheumatoid arthritis: A prospective longitudinal inception cohort study. *RMD Open* **5,** (2019).
353. Schett, G. Autoimmunity as a trigger for structural bone damage in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* **27,** 193–197 (2017).
354. Toes, R. & Pisetsky, D. S. Pathogenic effector functions of ACPA: Where do we stand? *Ann. Rheum. Dis.* **78,** 716–721 (2019).
355. Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5,** 178ra40–178ra40 (2013).
356. Avouac, J., Gossec, L. & Dougados, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **65,** 845–851 (2006).
357. Terao, C. *et al.* Effects of smoking and shared epitope on the production of anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese adult population. *Arthritis Care Res.* **66,** 1818–1827 (2014).
358. Ärlestig, L. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptides of IgG, IgA and IgM isotype and rheumatoid factor of IgM and IgA isotype are increased in unaffected members of multicase rheumatoid arthritis families from northern Sweden. *Ann. Rheum. Dis.* **71,** 825–829 (2012).
359. Nijenhuis, S., Zendman, A. J. W., Vossenaar, E. R., Pruijn, G. J. M. & Vanvenrooij, W. J. Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: Clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clinica Chimica Acta* **350,** 17–34 (2004).
360. Sebbag, M. *et al.* The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **95,** 2672–2679 (1995).
361. Young, B. J. J., Clark, C. J. M., Hamblin, T. J., Mallya, R. K. & Leslie, R. D. G. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* **2,** 97–99 (1979).
362. Lloyd, K. A. *et al.* Differential ACPA binding to nuclear antigens reveals a PAD-independent pathway and a distinct subset of acetylation cross-reactive autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* **10,** 3033 (2019).
363. Kissel, T. *et al.* Antibodies and B cells recognising citrullinated proteins display a broad cross-reactivity towards other post-translational modifications. *Ann. Rheum. Dis.* **79,** 472–480 (2020).
364. De Moel, E. C. *et al.* In rheumatoid arthritis, changes in autoantibody levels reflect intensity of immunosuppression, not subsequent treatment response. *Arthritis Res. Ther.* **21,** 28 (2019).
365. Mikuls, T. R. *et al.* Autoantibodies to Malondialdehyde–Acetaldehyde Are Detected Prior to Rheumatoid Arthritis Diagnosis and After Other Disease Specific Autoantibodies. *Arthritis Rheumatol.* **72,** 2025–2029 (2020).
366. Meissner, Y. *et al.* Serious adverse events and the risk of stroke in patients with

rheumatoid arthritis: Results from the German RABBIT cohort. *Ann. Rheum. Dis.* **76,** 1583–1590 (2017).

367. Harrold, L. R. *et al.* Comparative effectiveness of abatacept versus tocilizumab in rheumatoid arthritis patients with prior TNFi exposure in the US Corrona registry. *Arthritis Res. Ther.* **18,** 280 (2016).
368. Mouterde, G. *et al.* Outcome of patients with early arthritis without rheumatoid factor and ACPA and predictors of rheumatoid arthritis in the ESPOIR cohort. *Arthritis Res. Ther.* **21,** 140 (2019).
369. 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,** 276 (2016).
370. de Rooy, D. P. C., van der Linden, M. P. M., Knevel, R., Huizinga, T. W. J. & van der Helm-van, A. H. M. Predicting arthritis outcomes-what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? *Rheumatol.* **50,** 93–100 (2011).
371. Nakabo, S. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies are detectable in various connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* **44,** 1384–1388 (2017).
372. Challener, G. J. *et al.* Anti-carbamylated protein antibody levels correlate with anti-sa (citrullinated vimentin) antibody levels in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **43,** 273–281 (2016).
373. Hadlandsmyth, K., Mosher, H., Vander Weg, M. W. & Lund, B. C. Decline in Prescription Opioids Attributable to Decreases in Long-Term Use: A Retrospective Study in the Veterans Health Administration 2010–2016. *J. Gen. Intern. Med.* **33,** 818–824 (2018).
374. Haibach, J. P. *et al.* Military and veteran health behavior research and practice: challenges and opportunities. *J. Behav. Med.* **40,** 175–193 (2017).
375. Hoerster, K. D. *et al.* Health and health behavior differences: U.S. military, veteran, and civilian men. *Am. J. Prev. Med.* **43,** 483–489 (2012).
376. Murphy, D., Iversen, A. & Greenberg, N. The mental health of veterans. *J. R. Army Med. Corps* **154,** 136–139 (2008).
377. Ebel, A. V. *et al.* Association of Agricultural, Occupational, and Military Inhalants With Autoantibodies and Disease Features in US Veterans With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **73,** 392–400 (2021).
378. Martinez-Lavin, M. & Tejada-Ruiz, M. Gulf war illness, post-HPV vaccination syndrome, and Macrophagic Myofasciitis. Similar disabling conditions possibly linked to vaccine-induced autoimmune dysautonomia. *Autoimmun. Rev.* **19,** (2020).
379. Artenstein, A. W. Vaccines for military use. *Vaccine* **27,** (2009).
380. Assari, S. Veterans and risk of heart disease in the United States: A cohort with 20 years of follow up. *Int. J. Prev. Med.* **5,** 703–709 (2014).
381. Hinojosa, R. Sex, age, race/ethnicity, veteran status, and the likelihood of reporting cardiovascular conditions in the national health interview survey. *J. Cardiovasc. Nurs.* **34,** 215–221 (2019).
382. Lieber, C. S., Weiss, D. G., Groszmann, R., Paronetto, F. & Schenker, S. II. Veterans Affairs Cooperative Study of Polyenylphosphatidylcholine in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **27,** 1765–1772 (2003).

383. Carson, J. S. *et al.* Antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts can help identify patients with abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* **63,** 477–485 (2016).
384. Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M. & Gershwin, M. E. Definition of human autoimmunity - autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **9,** (2010).
385. Palma, J., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, J. & Deptuła, W. Natural antibodies – Facts known and unknown. *Cent. Eur. J. Immunol.* **43,** 466–475 (2018).
386. Thiagarajan, D. *et al.* Antibodies against Phosphorylcholine and Malondialdehyde during the First Two Years of Life. *J. Immunol.* **205,** 2109–2116 (2020).
387. Grönwall, C. *et al.* Modulation of natural IgM autoantibodies to oxidative stress-related neo-epitopes on apoptotic cells in newborns of mothers with anti-Ro autoimmunity. *J. Autoimmun.* **73,** 30–41 (2016).
388. Wang, G., Pierangeli, S. S., Papalardo, E., Ansari, G. A. S. & Khan, M. F. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: Correlation with disease activity. *Arthritis Rheum.* **62,** 2064–2072 (2010).
389. Amara, A. *et al.* Autoantibodies to malondialdehyde-modified epitope in connective tissue diseases and vasculitides. *Clin. Exp. Immunol.* **101,** 233–238 (1995).
390. Rahman, M. *et al.* IgM antibodies against malondialdehyde and phosphorylcholine are together strong protection markers for atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: Regulation and underlying mechanisms. *Clin. Immunol.* **166-167,** 27–37 (2016).
391. Chen, Y., Park, Y.-B., Patel, E. & Silverman, G. J. IgM Antibodies to Apoptosis-Associated Determinants Recruit C1q and Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* **182,** 6031–6043 (2009).
392. Grönwall, C. & Silverman, G. J. Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* **34 Suppl 1,** (2014).
393. Ajeganova, S., Andersson, M. L. E., Frostegård, J. & Hafström, I. Higher levels of anti-phosphorylcholine autoantibodies in early rheumatoid arthritis indicate lower risk of incident cardiovascular events. *Arthritis Res. Ther.* **23,** (2021).
394. Solans, R. *et al.* Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: Evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum.* **43,** 894–900 (2000).
395. Finckh, A., Liang, M. H., Van Herckenrode, C. M. & De Pablo, P. Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Care Res.* **55,** 864–872 (2006).
396. Van Dongen, H. *et al.* Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **56,** 1424–1432 (2007).
397. Raza, K., Mullazehi, M., Salmon, M., Buckley, C. D. & Rönnelid, J. Anti-collagen type II antibodies in patients with very early synovitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **67,** 1354–1355 (2008).
398. Morgan, K. *et al.* Antibodies to type II and XI collagens: Evidence for the formation of antigen specific as well as cross reacting antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **47,** 1008–1013 (1988).
399. Kim, W. U. *et al.* IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **27,** 575–581 (2000).

400. Fujii, K., Tsuji, M., Kitamura, A. & Murota, K. The diagnostic significance of anti-Type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int. Orthop.* **16,** 272–276 (1992).

401. Cook, A. D., Rowley, M. J., Mackay, I. R., Gough, A. & Emery, P. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis: Correlation with disease progression. *Arthritis Rheum.* **39,** 1720–1727 (1996).

402. Manivel, V. A. *et al.* Anticollagen type II antibodies are associated with an acute onset rheumatoid arthritis phenotype and prognosticate lower degree of inflammation during 5 years follow-up. *Ann. Rheum. Dis.* **76,** 1529–1536 (2017).

403. Cook, A. D., Rowley, M. J., Stockman, A., Muirden, K. D. & Mackay, I. R. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **21,** 1186–1191 (1994).

404. Andriopoulos, N. A., Mestecky, J., Miller, E. J. & Bradley, E. L. Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **19,** 613–617 (1976).

405. Clague, R. B., Shaw, M. J. & Lennox Holt, P. J. Incidence of serum antibodies to native type I and type II collagens in patients with inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **39,** 201–206 (1980).

406. Clague, R. B. Autoantibodies to cartilage collagens in rheumatoid arthritis. Do they perpetuate the disease or are they irrelevant? *Rheumatology* **28,** 1–4 (1989).

407. Morgan, K. What do anti-collagen antibodies mean? *Ann. Rheum. Dis.* **49,** 62–65 (1990).

408. Möttönen, T. *et al.* Antibodies against native type ii collagen do not precede the clinical onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31,** 776–779 (1988).

409. Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* **2,** 1269–1275 (2007).

410. Miyoshi, M. & Liu, S. Collagen-induced arthritis models. *Methods Mol. Biol.* **1868,** 3–7 (2018).

411. Boissier, M. C., Chiocchia, G., Texier, B. & Fournier, C. Pattern of humoral reactivity to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **78,** 177–183 (1989).

412. Rowley, M., Tait, B., Mackay, I. R., Cunningham, T. & Phillips, B. Collagen antibodies in rheumatoid arthritis. Significance of antibodies to denatured collagen and their association with HLA-DR4. *Arthritis Rheum.* **29,** 174–184 (1986).

413. He, X., Kang, A. H. & Stuart, J. M. Anti-human type II collagen CD19+ B cells are present in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *J. Rheumatol.* **28,** 2168–2175 (2001).

414. Morgan, K., Clague, R. B., Reynolds, I. & Davis, M. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **32,** 333–335 (1993).

415. Pereira, R. S. *et al.* Disappearing Collagen Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *The Lancet* **326,** 501–502 (1985).

416. Morgan, K. *et al.* A longitudinal study of anticollagen antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **32,** 139–145 (1989).

417. Clague, R. B. *et al.* Serum antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis: Comparison of 6 immunological methods and clinical features. *Ann. Rheum. Dis.* **42,**

537–544 (1983).

418. Morgan, K. *et al.* Incidence of antibodies to native and denatured cartilage collagens (types II, IX, and XI) and to type i collagen in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **46,** 902–907 (1987).
419. Williams, R. O., Williams, D. G. & Maini, R. N. Anti-type II collagen ELISA: Increased disease specificity following removal of anionic contaminants from salt-fractionated type II collagen. *J. Immunol. Methods* **147,** 93–100 (1992).
420. Kirk, A. P. *et al.* Pepsinogen - An immunoglobulin binding artefact in 'collagen' preparations. *Clin. Exp. Immunol.* **65,** 671–678 (1986).
421. Nehring, J. *et al.* Autoantibodies against Albumin in patients with systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **9,** 2090 (2018).
422. Mogues, T., Li, J., Coburn, J. & Kuter, D. J. IgG antibodies against bovine serum albumin in humans - Their prevalence and response to exposure to bovine serum albumin. *J. Immunol. Methods* **300,** 1–11 (2005).
423. Pérez-Maceda, B., López-Bote, J. P., Langa, C. & Bernabeu, C. Antibodies to dietary antigens in rheumatoid arthritis - possible molecular mimicry mechanism. *Clin. Chim. Acta* **203,** 153–165 (1991).
424. Wei, Y., Chen, L., Chen, J., Ge, L. & He, R. Q. Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC Cell Biol.* **10,** (2009).
425. Syrovy, I. & Hodny, Z. In vitro non-enzymatic glycosylation of myofibrillar proteins. *Int. J. Biochem.* **25,** 941–946 (1993).
426. Kong, F. Lou, Cheng, W., Chen, J. & Liang, Y. D-Ribose glycates β2-microglobulin to form aggregates with high cytotoxicity through a ROS-mediated pathway. *Chem. Biol. Interact.* **194,** 69–78 (2011).
427. Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S. & Bartosz, G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules* **19,** 18828–18849 (2014).
428. Daumer, K. M., Khan, A. U. & Steinbeck, M. J. Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J. Biol. Chem.* **275,** 34681–34692 (2000).
429. Olszowski, S., Mak, P., Olszowska, E. & Marcinkiewicz, J. Collagen type II modification by hypochlorite. *Acta Biochim. Pol.* **50,** 471–479 (2003).
430. Hilliquin, P., Borderie, D., Hernvann, A., Menkès, C. J. & Ekindjian, O. G. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40,** 1512–1517 (1997).
431. Kaur, H. & Halliwell, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* **350,** 9–12 (1994).
432. Mapp, P. I. *et al. Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium*. *Arthritis and Rheumatism* **44,** (2001).
433. Vossenaar, E. R. *et al.* The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **50,** 3485–3494 (2004).

434. Baeten, D. *et al. Specific Presence of Intracellular Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis Synovium Relevance to Antifilaggrin Autoantibodies*. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* **44,** (2001).

435. Chang, X. *et al.* Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **44,** 40–50 (2005).

436. Verheul, M. K. *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).

437. Verheul, M. K. *et al.* Mass-spectrometric identification of carbamylated proteins present in the joints of rheumatoid arthritis patients and controls. *Clin. Exp. Rheumatol.* **39,** 570–577 (2021).

438. Scherer, H. U., Häupl, T. & Burmester, G. R. The etiology of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **110,** 102400 (2020).

439. van Beers, J. J. B. C. *et al.* ACPA fine-specificity profiles in early rheumatoid arthritis patients do not correlate with clinical features at baseline or with disease progression. *Arthritis Res. Ther.* **15,** R140 (2013).

440. Hueber, W. *et al.* Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52,** 2645–2655 (2005).

441. Wang, D. *et al.* Diagnostic accuracy of 14-3-3 η protein in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* **23,** 1443–1451 (2020).

442. Winyard, P. G. *et al.* Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease. *Biochemical Society Transactions* **39,** 1226–1232 (2011).

443. Paik, D. C., Dillon, J., Galicia, E. & Tilson, M. D. The nitrite/collagen reaction: Non-enzymatic nitration as a model system for age-related damage. *Connect. Tissue Res.* **42,** 111–122 (2001).

444. Chrysant, S. G. & Chrysant, G. S. The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: a mini review. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **16,** 559–565 (2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

ANEXO 1. Improved classification of rheumatoid arthritis with a score including anti-acetylated ornithine antibodies. Rodríguez-Martínez L, Bang H, Regueiro C, et al.. Sci Rep 2020;10:19263. doi:10.1038/s41598-020-73919-y

ANEXO 2. Copia del informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CEIC). Código de Registro: 2014/387.

ANEXO 3. Copia del informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CEIC). Código de Registro: 2017/514.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO 1

Improved classification of rheumatoid arthritis with a score including anti-acetylated ornithine antibodies. Rodríguez-Martínez L, Bang H, Regueiro C, et al.. Sci Rep 2020;10:19263. doi:10.1038/s41598-020-73919-y

Contribución especifica en la publicación: Conceptualización y diseño del estudio, determinaciones de laboratorio, análisis de los resultados, redacción del primer borrador del manuscrito y participación en la revisión crítica del manuscrito.

Índices de calidad: La revista Scientific Reports cuenta con los siguientes factores de impacto calculados en el año 2020: 4.379 2-year impact factor, 5.133 5-year impact factor, 0.783 Immediacy index, 1.23250 Eigenfactor® score, 1.285 Article influence score y 3 2-year median, obtenidos del siguiente enlace: https://www.nature.com/srep/about . Una descripción de cada índice puede encontrarse en el siguiente enlace: https://www.nature.com/nature-portfolio/about/journal-metrics . Además cuenta con un factor de impacto de 4.380 según 2020 JOURNAL IMPACT FACTOR (JIF) que se corresponde con un cuartil Q1 y de 0.80 según Journal Citation Indicator (JCI) que se corresponde con un cuartil Q1 en la categoría de ciencias multidisciplinares, ambos obtenidos de Journal Citation Reports (JCR): https://jcr.clarivate.com/jcr-jp/journal-profile?journal=SCI%20REP-UK&year=2020&fromPage=%2Fjcr%2Fhome . La revista también presenta un índice H de 213 y un índice Scimago Journal and Country Rank (SJR 2020) de 1.24 calculado con Scimago: https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100200805&tip=sid&clean=0 y un índice CiteScore 2020 de 7.1 obtenido de la lista disponible en Scopus: https://www.scopus.com/home.uri

Autorización de la revista: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.



scientific reports

Check for updates

OPEN

Improved classification of rheumatoid arthritis with a score including anti-acetylated ornithine antibodies

Lorena Rodriguez-Martínez[1], Holger Bang[2], Cristina Regueiro[1], Laura Nuño[3], Ana Triguero-Martinez[4], Diana Peiteado[3], Ana M. Ortiz[4], Alejandro Villalba[3], Ana Martinez-Feito[3], Alejandro Balsa[3], Isidoro Gonzalez-Alvaro[4] & Antonio Gonzalez[1,5]✉

The presence of rheumatoid factor (RF) or anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) autoantibodies contributes to the current rheumatoid arthritis (RA) classification criteria. These criteria involve stratification on antibody levels, which limits reproducibility, and underperform in the RA patients without RF and anti-CCP. Here, we have explored if two anti-acetylated peptide antibodies (AAPA), anti-acetylated lysine (AcLys) and anti-acetylated ornithine (AcOrn), could improve the performance of the current criteria. The analysis was done in 1062 prospectively-followed early arthritis (EA) patients. The anti-AcOrn were more informative than the anti-AcLys, the conventional RA antibodies and the anti-carbamylated protein antibodies. The anti-AcOrn produced a classification that did not require antibody levels and showed improved specificity (77.6% *vs.* 72.6%, p = 0.003) and accuracy (79.0% *vs.* 75.8%, p = 0.002) over the current criteria. These improvements were obtained with a scoring system that values concordance between anti-AcOrn, RF and anti-CCP. No significant gain was obtained in sensitivity (80.2% *vs.* 78.8%, p = 0.25) or in improving the classification of the RA patients lacking RF and anti-CCP, although the anti-AcOrn ranked first among the analysed new antibodies. Therefore, the anti-AcOrn antibodies could contribute to the improvement of RA classification criteria by exploiting antibody concordance.

The patients with rheumatoid arthritis (RA) should be distinguished from other forms of arthritis for research and clinical management[1,2]. The prompt identification at the onset of arthritis is difficult to achieve because of the lack of discriminant symptoms or signs and the absence of diagnostic tests[1,3]. This limitation has been addressed through the elaboration of classification criteria by the American College of Rheumatology (ACR) and the European League Against Rheumatism, which primary focus is to identify homogeneous groups of patients for research[2,4]. The current criteria were developed in 2010 to avoid the delay associated with the previous criteria dating from 1987 to permit clinical trials early in the disease course. One of the novelties of the 2010 criteria has been a scoring system that gives a remarkable weight to the best-known RA specific autoantibodies, the rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) antibodies[2]. Specifically, the patients showing high levels of any of the two antibodies receive 3 points, whereas the positive patients without high levels receive 2 points. These scores are a large fraction of the 6 points required for RA classification[2]. These and other changes in the 2010 EULAR/ACR criteria have achieved the intended objective of a much prompt classification[5,6]. However, there is still room for improvement[5–12].

Two areas have been identified that could lead to improvements by incorporating new RA autoantibodies[5–7,13–15]. The most evident would be if the new antibody could cover the need of a biomarker for

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[1]Experimental and Observational Rheumatology and Rheumatology Unit, Instituto de Investigacion Sanitaria - Hospital Clínico Universitario de Santiago (IDIS), Travesia Choupana, sn., 15706 Santiago de Compostela, Spain. [2]Orgentec Diagnostika GmbH, Carl-Zeiss-Straße 49-51, 55129 Mainz, Germany. [3]Rheumatology Department, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IDIPAZ), Paseo de la Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain. [4]Rheumatology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-lP), Calle de Diego de León, 62, 28006 Madrid, Spain. [5]Laboratorio Investigacion 10, Hospital Clinico Universitario de Santiago, Edificio de consultas, planta -2, Travesia de Choupana, sn, 15706 Santiago de Compostela, Spain. ✉email: agmartinezp@ser.es

the 15–45% RA patients that lack RF and anti-CCP antibodies[7,13]. The accuracy of the current classification criteria for these "seronegative" patients is much lower than for the patients bearing RF or anti-CCP[5–8,11,12]. However, the new RA autoantibodies analysed so far have provided small gains in this area because of their concordance with RF and anti-CCP antibodies[16–18]. It is unclear if this characteristic also applies to the anti-acetylated peptide antibodies (AAPA)[18]. These antibodies are remarkable in comparison with other new RA autoantibodies[18–23]. Perhaps, they are only comparable in reproducibility and apparent diagnostic characteristics to the anti-carbamylated protein antibodies (anti-CarP)[24–26], although the two are less sensitive for RA than RF and anti-CCP antibodies. The AAPA are assayed with a modification of the peptide from the mutated citrullinated vimentin (MCV) kit, in which citrulline is replaced by acetylated lysine (AcLys) or acetylated ornithine (AcOrn)[18,19]. The test shows low levels of cross-reactivity with anti-CCP and anti-CarP antibodies[18]. In spite of these promising clues, the potential value of the AAPA for RA classification has not been fully assessed. The available data shows discrepancies regarding their sensitivity for the "seronegative" patients. On one side, the report where they were first described observed a 13% sensitivity in the anti-CCP negative patients[18]. On the other, two meeting abstracts have reported > 40% sensitivity in the "seronegative" RA patients[20,21]. These latter results indicate the need to determine if the AAPA could significantly fill the need of a biomarker for the "seronegative" patients.

An alternative area of improvement of the 2010 EULAR/ACR classification criteria will aim to improve their specificity. Particularly, since the 2010 criteria show a loss of specificity relative to the 1987 criteria[5,6,10,12]. A loss that has been quantified at 4% across 12 studies[6]. The need for the highest specificity is taken very seriously because classification criteria are developed to obtain homogeneous groups of patients for research[3,5]. A way to obtain increased specificity has become possible very recently[14,15]. It exploits the concordance of autoantibodies to achieve high specificity, accuracy and reproducibility of the criteria. The concordance in antibody status, either positive or negative, is a well-known characteristic of RF and anti-CCP in the patients with RA. In other words, the fraction of antibody discordant subjects, subjects showing RF without anti-CCP or anti-CCP without RF, is much smaller in the RA patients than in the healthy controls and controls with other diseases[27–30]. This characteristic extends to the anti-CarP antibodies. In effect, the excess concordance of RF, anti-CCP and anti-CarP antibodies in the RA patients has been confirmed in a recent compilation of 12 studies[24]. All the studies showed the three antibodies were much more concordant in the RA patients than in the controls, either healthy controls, first degree relatives of RA patients, or disease controls[24]. This characteristic was exploited by us to replace the serological component of the ACR/EULAR 2010 classification criteria by a score based on the concordance of the anti-CarP, RF and anti-CCP autoantibodies. This score led to classify the patients with similar accuracy in our cohort[14], and, independently in another large cohort of patients with EA[15]. A replication that highlights the advantage of a scoring system that does not require antibody concentrations, its reproducibility. In effect, antibody concentrations vary between laboratories and it has been shown to limit reproducibility of the RA classification criteria[10].

Here, we have evaluated the two best-performing AAPA[18–20]. The first part of our analysis did not replicate the high sensitivity for seronegative patients previously reported by Studenic et al.[20,21]. However, the second part showed the anti-AcOrn antibodies led to the most accurate classification, significantly better than the 2010 ACR/EULAR classification criteria, with the concordance scoring system.

Patients and methods

Patients and samples. Patients included in the study comprised the 1062 EA patients used in a previous report[16]. They had been recruited in the PEARL (Princesa Early Arthritis Register Longitudinal) study[31] at Hospital Universitario La Princesa (from July 2001 to December 2014) and at Hospital Universitario La Paz (from January 1993 to December 2013)[32], both in Madrid. They presented 2 or more swollen joints for less than a year and were naïve for Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD) at the first visit. In addition, they had completed 2 years of follow-up and there was available serum from the baseline visit. At the end of the 2-year follow-up, these patients were classified according to the 1987 ACR classification criteria for RA[4]. This classification in RA and non-RA was taken as the gold standard for comparison. A choice based on the increase in sensitivity of the 1987 criteria at this time relative to the first visit. The EA clinic and the sample collections were approved by the La Paz University Hospital Ethics Committee and the Ethics Committee for Clinical Research of Hospital Universitario La Princesa (Ref. PI-518). The study was approved by the Autonomous Research Ethics Committee of Galicia (Ref. 2014/387 and 2017/514). All participants provided their written informed consent and all protocols and methods were conducted according to the relevant guidelines (Declaration of Helsinki, the Belmont Report and the Spanish Law of Biomedical Research no. 14/2007).

Determination of autoantibodies. We measured IgG autoantibodies against 2 acetylated peptides derived from vimentin, one of them with acetylated lysine (anti-AcLys) and the other with acetylated ornithine (anti-AcOrn) at position 7 of the peptide. The ELISA was performed according to the Orgentec protocol described elsewhere[18]. No peptides without acetylated amino-acids were assayed given the low frequency of reactivity against them in previous studies. Two different lots of the peptides, plates and other reagents were provided by Orgentec (Orgentec Diagnostika GmbH, Germany), but they are not commercially available. The cut-off for positivity was defined as the 98th percentile of antibody reactivity in the sera of 270 healthy controls from Hospital Clínico Universitario de Santiago (Santiago de Compostela, Spain). It corresponded to 64 U/ml for anti-AcLys and 55 U/mL for anti-AcOrn antibodies. The inter-assay coefficients of variability across all the ELISA plates were 3.8% and 3.3% for the anti-AcLys and anti-AcOrn antibodies using a control showing 159 and 152 U/mL, respectively. The status of the other autoantibodies (RF, anti-CCP and anti-CarP) was available from a previous study[16]. Precisely, the anti-CarP antibodies were determined using a homemade ELISA with in vitro carbamylated FCS, the IgM-RF was determined by nephelometry, and the anti-CCP antibodies by standardized

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ELISA. The particular anti-CCP kit was the anti-CCP2 Euro-Diagnostica Immunoscan RA (positive > 50 U/ml) for all patients in Hospital Universitario La Paz and until October 2010 in PEARL. Thereafter the QUANTA Lite CCP3 IgG and IgA assay of Inova Diagnostics (positive > 40 U/ml) was used in PEARL.

Statistical analysis. Continuous patient variables were compared with the U of Mann–Whitney test or t-test according to their distribution, whereas dichotomous variables were compared with 2×2 contingency tables. Quantile normalization of the optical densities was used to correct for differences between the two anti-acetylated peptide ELISA lots. Most analyses considered only two statuses for each antibody, positive or negative, but other analyses considered three levels following the 2010 ACR/EULAR classification criteria[2]. These three levels were: negative, positive below 3 times the cut-off value for each antibody, and positive over 3 times the cut-off. The cut-offs for anti-CCP and RF antibodies were taken from the manufacturer and the 3 times cut-off value was separately calculated for each anti-CCP kit in each EAC. The cut-off for anti-AcLys and anti-AcOrn antibodies was calculated as described above whereas that of anti-CarP antibodies has been defined previously[26]. Concordance between antibody status was measured with the Goodman and Kruskal's gamma coefficient (γ), (ranging from + 1 = perfect concordance to − 1 = complete discordance). In addition, the association between the antibodies and RA was assessed with logistic regression accounting for age, sex, the specific EA clinic, and the status of other autoantibodies. Other parameters of classification performance were sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR−) and the area under (AUC) the receiver operating characteristic (ROC) curves. The sensitivity and specificity of different antibodies or antibody combinations were compared with the McNemar's test for paired contingency tables. Also, we assessed the RA classification based on the concordance of the autoantibodies[14]. For the logistic regression analysis, only the main effects were ascertained. Moreover, the logistic regression fit to the data was assessed with the Nagelkerke R^2, and the Akaike's Information Criterion (AIC). The Nagelkerke R^2 estimates the predictive power of the model as a proportional reduction in error variance. The AIC estimates the relative amount of information lost by any model. Therefore, the R^2 increases with the predictive power of the model, whereas the AIC reaches lower values for the best models. Differences in AIC > 2 between any two models are meaningful, whereas differences > 10 are interpreted as rejecting the poorer model[33]. Finally, the impact of the different serological criteria on the overall classification (serological + non-serological criteria) was explored in the patients from PEARL, who featured all the required information. This exploration was undertaken in two ways. The first consisted of replacing the serological scores in the 2010 ACR/EULAR criteria. The second classified the patients with logistic regression that combined the non-serological and serological criteria applying cut-offs that were adjusted to obtain a constant sensitivity. The results of these classifications were expressed as specificity (true nonRA/observed nonRA patients), sensitivity (true RA/observed RA patients) and accuracy ((true nonRA + true RA)/all patients). The statistical tests were performed with R through the Jamovi application[34,35] and Statistica version 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK) except for the ROC analysis, which was done with SPSS version 15.0 (Chicago, USA). Area proportional Venn diagrams were produced with EulerAPE 3.0[36].

Results

Prevalence of the anti-acetylated peptides antibodies in the EA patients. The 1062 patients with EA were divided at the end of the 2 years of follow-up into 49.9% with RA and 50.1% without RA. This latter group included patients with undifferentiated arthritis (20%) and other less common diseases that add up to the remaining 30.1%. The diseases in the latter group were spondyloarthritis, Sjögren syndrome, systemic lupus erythematosus, psoriatic arthritis, inflammatory bowel disease… The retrospective analysis showed that the RA and non-RA patients already differed in several features at the first visit: age, length of the symptoms, disease activity, presence of erosions and the prevalence of the autoantibodies (Table 1). In effect, the five antibodies, including the two AAPA, were very significantly associated with RA.

To complete the preceding analyses, the association between the presence of the AAPA and RA was assessed with logistic regression accounting for other antibodies and variables (Supplementary Table S1 online). This analysis showed that the anti-AcLys antibodies were no longer associated when the presence of anti-CCP and RF were considered. In contrast, the anti-AcOrn antibodies remained significantly associated when the other autoantibodies were considered, even when the anti-CarP antibodies were added. In the most complete analysis with four antibodies, the strength of the association with RA went in decreasing order from the anti-CCP antibodies (OR 10.0) to RF (OR 2.9), the anti-AcOrn antibodies (OR 1.6) and the anti-CarP antibodies (OR 1.6). The combination of the two AAPA was marginally more associated than the anti-AcOrn antibodies separately (Supplementary Table S1 online).

We also explored if the stratification of the AAPA by their levels could add discriminant value. Three levels were defined as in the ACR/EULAR 2010 classification criteria: negative and above or below 3 times the cut-off of the positive patients (Supplementary Table S2 online). Unlike the RF and anti-CCP antibodies, the high levels of the AAPA were not more associated with RA than the low levels. These results excluded the AAPA concentration strata from RA classification rules.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Relations between the autoantibodies. The two AAPA were strongly concordant in status, both in the RA ($\gamma = 0.89$, $p = 8.9 \times 10^{-70}$) and non-RA patients ($\gamma = 0.98$, $p = 1.5 \times 10^{-119}$). As a consequence, their relations with RF and the anti-CCP antibodies were similar (Fig. 1). For the anti-AcOrn antibodies, the largest two strata of RA patients comprised the triple-positive and the anti-CCP/RF double-positive patients (Fig. 1A). The subset of patients positive only for the anti-AcOrn antibodies, which is of particular relevance to increase the sensitivity of RA classification, represented only 2.3% of the total (or 9.3% of the RF and anti-CCP seronegative RA patients). A completely different distribution was observed in the non-RA patients (Fig. 1B), where the larg-

	All = 1062	RA[a] = 530	Non-RA = 532	P[c]
Women, n (%)[b]	818 (77.0)	420 (79.2)	398 (74.8)	0.09
Age, median (IQR) years	52.0 (40.0–65.2)	54.0 (43.0–67.4)	49.2 (37.0–63.6)	2.5×10^{-05}
Delay, median (IQR) weeks	16.0 (8.0–28.1)	19.9 (11.0–30.7)	12.0 (6.0–26.4)	$1.6\times10^{-10\,\#}$
DAS28, median (IQR)	4.5 (3.4–5.8)	5.2 (3.9–6.3)	3.9 (2.9–4.9)	1.3×10^{-34}
Erosions, n (%)[d]	93 (10.5)	77 (14.6)	16 (4.5)	1.9×10^{-06}
Ever smoker, n (%)[d]	444 (45.1)	234 (46.0)	210 (44.2)	0.6
RF$^+$, n (%)	444 (41.8)	358 (67.5)	86 (16.2)	1.3×10^{-64}
anti-CCP$^+$, n (%)	397 (37.4)	351 (66.2)	46 (8.6)	9.1×10^{-84}
anti-CarP$^+$, n (%)	291 (27.4)	222 (41.9)	69 (13.0)	4.4×10^{-26}
anti-AcLys$^+$, n (%)	142 (13.4)	111 (21.1)	31 (5.8)	2.9×10^{-13}
anti-AcOrn$^+$, n (%)	236 (22.2)	191 (36.1)	45 (8.5)	2.6×10^{-27}
AAPA$^+$, n (%)	259 (24.5)	209 (39.7)	50 (9.4)	2.2×10^{-30}

Table 1. Clinical and serological features of the EA patients. [a]EA patients classified as RA or non-RA according to the 1987 ACR classification criteria at 2 years of follow-up. [b]Features corresponding to the first visit are presented. [c]p values correspond to the comparison of the RA and non-RA patients with the chi-squared or t-tests/U of Mann–Whitney test [#]. [d]Information was available for < 95% of the patients: ever smoker = 92.7%; erosions = 83.1%.

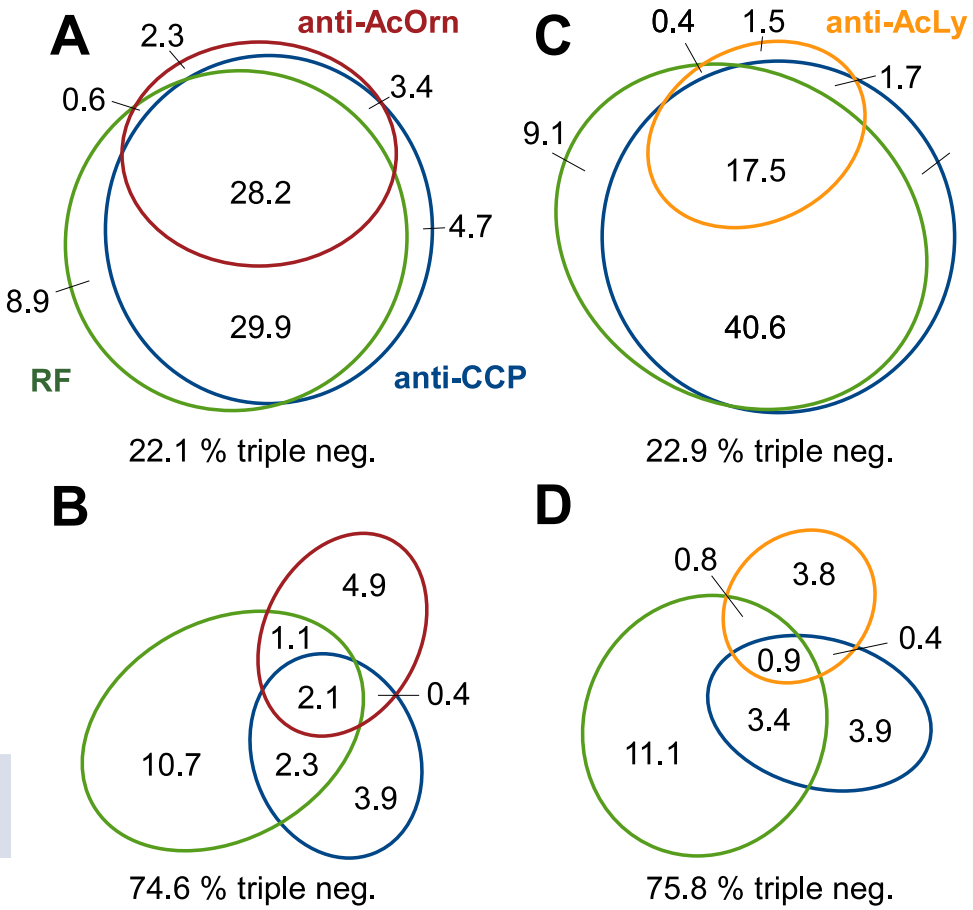


Figure 1. Relations of the AAPA with RF and the anti-CCP antibodies in the EA patients. The relations of the anti-AcOrn antibodies are shown in the (**A**) and (**B**) plots, whereas the anti-AcLys antibodies are shown in the (**C**) and (**D**) plots. The (**A**) and (**C**) plots represent the RA patients, whereas the (**B**) and (**D**) plots show the non-RA patients. The percentages are the fraction of the total.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	anti-AcLys	anti-AcOrn	AAPA	RF or anti-CCP	RF or anti-CCP or anti-AcLys	RF or anti-CCP or anti-AcOrn	RF or anti-CCP or AAPA
Sensitivity							
All[a]	21.1	36.1	39.7	75.7	77.1	77.9	78.2
Anti-CCP-	5.6	8.4	9.6	27.9	32.6	34.6	35.4
Anti-CCP-/RF-	6.3	9.3	10.2	Na[b]	6.3[c]	9.3[c]	10.2[c]
Specificity							
All	94.2	91.5	90.6	79.5	75.8	74.6	74.1
Anti-CCP-	95.1	93.4	92.6	87.0	82.9	81.7	81.1
Anti-CCP-/RF-	95.3	93.9	93.1	na	95.3[c]	93.9 [c]	93.1[c]

Table 2. Sensitivity and specificity of the AAPA for the RA classification of the EA patients. The antibodies were considered in isolation and combinations using the OR operator. [a]Sensitivity and specificity were evaluated in all EA patients and the specified subsets. [b]*na* not applicable. [c]Values already reported on the left columns but repeated for easy comparison.

est subgroup was negative for the three antibodies. They were followed by the positive for unique antibodies: RF, anti-AcOrn or anti-CCP. A notably similar pattern of relations was observed with the anti-AcLys antibodies in the non-RA patients (Fig. 1D). In contrast, the distribution of the anti-AcLys antibodies in the RA patients did not resemble that of the anti-AcOrn antibodies: it was dominated by an enlarged subgroup of anti-CCP/RF double-positive patients followed by the triple-negative patients and a reduced subgroup of triple-positive patients (Fig. 1C). It was notable that the two critical subsets for improving RA classification were less frequent in the anti-AcLys than the anti-AcOrn antibodies (Fig. 1A,C): the patients positive only for the AAPA and the triple-positive patients.

Diagnostic parameters of the AAPA. A variety of parameters assessing the AAPA contribution to RA classification were calculated (Table 2 and Supplementary Table S3 online). The fundamental parameters sensitivity and specificity were compared with the classical antibody combination: positive for "RF or anti-CCP" (Table 2). This analysis showed the AAPA were notably less sensitive than the classical antibody combination on the whole set of patients. In addition, the AAPA were positive in less than 11% of the anti-CCP$^-$ or the anti-CCP$^-$/RF$^-$ patients. In contrast, the AAPA showed high specificity (Table 2). It was higher than the specificity of the "RF or anti-CCP" combination and it was preserved in the "seronegative" patients, both anti-CCP$^-$ and anti-CCP$^-$/RF$^-$ patients. This high specificity suggested an improved classification could be obtained with an OR combination. The actual testing of the three- and four-antibody combinations showed very modest but significant increases in sensitivity (Table 2). The increases were of 1.4% with the anti-AcLys, 2.2% with the anti-AcOrn, and 2.5% with the combination of the two AAPA ($p < 0.015$ for all the comparisons with the "RF or anti-CCP" rule). These improvements were associated with a decrease in specificity that was of 3.7% with the anti-AcLys, 4.9% with the anti-AcOrn, and 5.4% with the AAPA combination ($p < 2.5 \times 10^{-5}$ for all the comparisons with the "RF or anti-CCP" reference). In other words, the benefit–cost ratio of the antibody combinations was 1:2.2 for the "RF or anti-CCP or anti-AcOrn antibodies" and the "RF or anti-CCP or anti-AcOrn or anti-AcLys antibodies" rules. This ratio meant that for each new correctly classified RA patient there will be 2.2 non-RA patients falsely classified as having RA. In turn, the benefit–cost ratio of the rule with the anti-AcLys antibodies was 1:2.6 and the recently reported with the anti-CarP antibodies was 1:3.7[16]. These values were not significantly different between them. As an alternative, we tested the value of combining the antibodies with the AND operator but this approach resulted in a notable decrease in the sensitivity, which is the parameter with the highest need for improvement (Supplementary Table S4 online). None of the other analysed parameters (Supplementary Table S3 online) showed a significant improvement with the AAPA.

Improved serological classification based on antibody concordance. The relations of RF, anti-CCP and anti-AcOrn antibodies presented above (Fig. 1A,B) suggested their concordance could be useful for RA classification. This hypothesis was further supported by the discrimination afforded with the number of positive antibodies relative to the serological component of the 2010 ACR/EULAR criteria (Supplementary Table S5 online). Therefore, we directly compared the serological component of the 2010 criteria with the antibody concordance in separate logistic regression models (Table 3). In the separate logistic regressions, the highest OR (48.7) corresponded to the concordant presence of the three antibodies (RF, anti-CCP and anti-AcOrn antibodies). It was followed by the concordant presence of two antibodies (OR 28.5) and at a similar level the high levels of RF or anti-CCP antibodies (OR 25.9). The same order was observed within the logistic model combining the two serological criteria (OR 11.4, 7.9 and 4.4, respectively, Table 3). This hierarchy indicates a higher weight of the concordance that could lead to better classification than with the 2010 serological component. The improvement was demonstrated with the comparison of the overall performance of the models, which was done with the R^2 and AIC parameters. The R^2 is better when it is larger, as it was in the concordance model (0.451) compared with the 2010 serological component (0.422). In contrast, the AIC is better when is lower, as in the concordance model (1037) relative to the 2010 serological criteria (1067). This latter difference is considered discriminant (> 10). A further improvement in performance was obtained with the combined model ($R^2 = 45.6\%$, AIC = 1027).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Stratum	2010 ACR/EULAR[a] OR (95% CI)[b]	Ccdc. anti-AcOrn OR (95% CI)	2010 + Ccdc. anti-AcOrn OR (95% CI)
3	25.9 (17.9–37.6)	–	4.4 (1.9–10.4)
2	2.5 (1.6–3.8)	–	1.2 (0.5–2.6)[c]
3Ab	–	48.7 (25.5–93.0)	11.4 (4.0–32.9)
2Ab	–	28.5 (17.1–47.4)	7.9 (3.0–20.4)
1Ab	–	2.7 (1.9–3.9)	1.6 (0.8–3.2)[c]

Table 3. Comparison of logistic regression models for RA classification based on the serological 2010 criteria, the antibody concordance, and their combination. [a]The serological component of the 2010 ACR/EULAR RA classification criteria, the concordance (Ccdc.) of RF, anti-CCP and anti-AcOrn autoantibodies, and their combination (2010 + Ccdc.) [b]OR and their 95% confidence intervals. [c]This stratum did not contribute significantly to RA classification.

Serological component[a]	Scores[b] Specificity	Sensitivity	Accuracy	Logistic regression[c] Specificity	Accuracy
2010 ACR/EULAR	72.6	78.8	75.8	73.8	77.1
Ccdc. anti-AcOrn	77.6	80.2	79.0	79.2	80.0
Ccdc. anti-AcOrn + 2010	77.6	81.3	79.5	80.3	80.6
Ccdc. anti-CarP	75.3	78.8	77.1	75.7	77.8
Ccdc. anti-CarP + 2010	76.4	80.6	78.8	79.5	80.0

Table 4. Performance of the classification criteria for RA with different serological components. [a]2010 ACR/EULAR = RF or anti-CCP antibodies as in the 2010 ACR/EULAR classification criteria; Ccdc. *anti-AcOrn* concordant for RF, anti-CCP and anti-AcOrn antibodies; Ccdc. *anti-CarP* concordant for RF, anti-CCP and anti-CarP antibodies. [b]Scores were as in the 2010 ACR/EULAR criteria; as in Regueiro et al.[16] depending on the number of concordant antibodies: 5 for 3, 3 for 2, and 1 for 1 antibodies; or combining the two criteria as: 5 for 3 or 2 antibodies with high levels, 3 for 3 or 2 antibodies with low levels, and 1 for 1 antibody irrespective of the levels. [c]Classification was done with logistic regression including each component: joint symptoms, serology, symptom duration, and acute-phase reactants with the cut-off adjusted to obtain 80% sensitivity. This analysis is slightly different from the reported in Regueiro et al. where the three non-serological factors were grouped.

In contrast, none of the models based on the concordance with other antibodies, anti-AcLys ($R^2 = 44.6\%$, AIC = 1038) or anti-CarP antibodies ($R^2 = 44.2\%$, AIC = 1048), was better than the including anti-AcOrn.

Improved RA classification with the anti-AcOrn antibodies. The final test to ascertain the classification consists in combining the serological models with the non-serological components of the 2010 ACR/EULAR criteria (Table 4). This analysis was only possible in the PEARL cohort (537 EA patients) because of data availability. The results showed an improvement in specificity and accuracy with the antibody concordance of RF, anti-CCP and anti-AcOrn antibodies. In more detail, the specificity was significantly larger than with the 2010 criteria (77.6 *vs.* 72.6%, $p = 0.003$). This increase was accompanied by a numerically larger sensitivity (80.2 *vs.* 78.8%, $p = 0.25$) and a significantly improved accuracy (79.0 *vs.* 75.8%, $p = 0.002$). This improvement was not attributable to the specific scoring that was used as it was replicated with the logistic regression model without predefined scores (Table 4; specificities: 79.2 *vs.* 73.8%, $p = 9.5 \times 10^{-6}$; accuracies: 80.0 *vs.* 77.1%, $p = 0.007$). Another notable result of these analyses was that the classification incorporating a combination of the serological scores (Ccdc. anti-AcOrn + 2010 in Table 4) was not better than the based only on antibody concordance (Ccdc. anti-AcOrn in Table 4).

The improvement in RA classification with the anti-AcOrn antibodies was significantly larger than the obtained with the anti-CarP antibodies, which we had recently reported[16], and that is shown here for direct comparison (Table 4; scores specificity: 77.6 *vs.* 75.3%, $p = 0.03$, and accuracy: 79.0 *vs.* 77.1%, $p = 0.01$; logistic regression specificity: 79.2 *vs.* 75.7%, $p = 0.002$, and accuracy: 80.0 *vs.* 77.8%, $p = 0.01$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Discussion

We have identified the anti-AcOrn as RA autoantibodies that in our patients improved the specificity and accuracy of the RA classification and freed it from the reliance on antibody levels. The significant improvement was obtained with one of the two explored approaches: the use of a scoring system based on the antibody concordance. In this approach, the anti-AcOrn concordance with RF and anti-CCP antibodies was superior to that of the anti-AcLys and anti-CarP antibodies. The improvements over the 2010 ACR/EULAR criteria were significant in specificity and accuracy, and not significant in sensitivity. These improvements should stimulate replication and further analysis. Only after replication and expert consensus, a recommendation for changes in the RA

classification could be envisaged. The other explored approach, aimed to use the anti-AcOrn as a biomarker for the RF and anti-CCP "seronegative" patients, did not result in meaningful improvements.

Other reports have already signalled the anti-AcOrn antibodies outperform several other AAPA as RA biomarkers although they did not explore RA classification[18–22]. The combination of anti-AcOrn with anti-AcLys did not result in significant improvements in sensitivity, probably because of the high concordance between them. In this regard, it is worth mentioning the AAPA sensitivity for the "seronegative" RA patients was much lower than the observed in two previous reports[20,21]. These two reports are only available as meeting abstracts, a circumstance that limits the search for possible causes of the discrepant results. In contrast, our results are in line with the 13.2% anti-CCP negative patients that were positive for the anti-AcLys antibodies in the unique additional article with this information[18].

The low sensitivity in the RF and anti-CCP "seronegative" patients indicates the AAPA will not be of utility to improve the classification of this subset of patients[7,8,11–13]. Unfortunately, this seems to be the common outcome with the autoantibodies given their concordant presence in the RA patients[16–18]. Even, the concordance may reflect shared underlying pathways, as suggested by the recent work indicating that smoking predisposes primarily to RA with multiple autoantibodies[37–39].

Independently of its causes, the concordance of antibodies is a defining characteristic of RA patients[16–18,24,27–30], which could be exploited to improve RA classification in another way[14,15]. The improvement exploits the better specificity of the concordant presence of two or three antibodies relative to any of them in isolation. An observation that was evident in the 12 studies compiled in Verheul et al.[24]. Therefore, we have proposed a scoring system that gives a higher weight to the serologic component than the 2010 ACR/EULAR criteria (5 points for the top serological score of a total of 6 needed)[14]. This approach has led to improvements in the classification with the anti-CarP antibodies. Improvements that were independently replicated in the Leiden EA cohort[15]. Here, a similar pattern of concordance was found with the anti-AcOrn antibodies in place of the anti-CarP antibodies. This concordance criteria with anti-AcOrn led to higher specificity and accuracy than the 2010 ACR/EULAR criteria and higher also than the obtained with the anti-CarP antibodies. The improvements obtained with the anti-AcOrn concordance scores over the 2010 ACR/EULAR criteria were of significant magnitude (specificity 5% and accuracy 4.2%). The relevance of the improvement is revealed considering that classification criteria are a tool to identify homogeneous groups of patients for research[2–5]. An objective that calls for the highest possible specificity to permit replication, comparison and transference of the research results. Our results suggest it will be possible to retain the increased sensitivity of the 2010 criteria for early RA without paying the price of decreased specificity relative to the 1987 criteria (a loss quantified at 4%)[5,6].

The independence form antibody levels is an advantage of the anti-AcOrn over the anti-CarP antibodies whose concordance scores need to be combined with scores based on the RF and anti-CCP levels to reach similar specificity and accuracy. The independence from antibody levels is also an advantage over the 2010 ACR/EULAR criteria and another previously explored modification on the criteria[10]. An important component of the latter was requiring high levels of RF to increase specificity. However, high levels of RF were less reproducible than RF positivity between the three analysed cohorts leading the authors to propose dropping RF levels from the classification criteria[10]. The same report showed that the distinction in RF levels added little to classification. This could be explained by the correlation between high RF levels and anti-CCP presence observed in our patients (Supplementary Table S6) and in other sets of RA patients[38–40]. Therefore, the lack of reliance on the RF and anti-CCP levels will permit increasing reproducibility of the RA classification based on anti-AcOrn concordance without losing accuracy.

Another aspect that could affect the reproducibility of the findings pertains to differences in the patient populations. In this respect, the frequency of smokers was lower in our patients than in some other European EA cohorts[37–39]. However, we did not find that smoking alters the association of antibody concordance with the RA classification. In effect, the OR for RA in the concordant patients for 3, or 2 antibodies (RF, anti-CCP or anti-AcOrn) were very similar in ever smokers and the global set of patients (46.8 *vs.* 48.7, for 3 antibodies and 30.3 *vs.* 28.3 for 2 antibodies, respectively).

It is important to highlight that our results do not imply the anti-AcOrn antibodies are involved in the RA pathogenesis. This is a question that should be solved with other types of experiments. Also, additional experiments will be needed to identify the natural antigen recognized by the anti-AcOrn antibodies because the peptide used in our assay is artificial in several respects[18,19]. This field is at a stage that could be similar to the experienced by the anti-citrullinated protein antibodies some decades ago[41,42]. They were first detected as antibodies against cutaneous proteins, keratin or epidermal filaggrin[43,44]. Only after years of study, it was discovered that these antibodies were targeting citrullinated proteins that are present in the inflamed joints as vimentin, fibrinogen, enolase or histones[41,42]. It is encouraging that the first natural acetylated protein autoantigens, acetylated histones, have already been identified as RA autoantigens with a possible role in pathogenesis via antibody-NETosis interactions[45]. Whereas these questions are clarified, the anti-AcOrn antibodies can be used as biomarkers because they reveal a fraction of the spectrum of antibodies not uncovered with the other autoantibodies studied here. This extreme was evidenced in the logistic regression analysis including RF, anti-CCP and anti-CarP antibodies in addition to the anti-AcOrn antibodies. These same arguments show that the improvements we have found are not undermined by the recent studies demonstrating various levels of cross-reactivity between RA autoantibodies[46,47].

A limitation of this study is the variation between the two lots of the AAPA assays we used that required normalization and reestablishment of the threshold for positivity. We do not know if this problem was punctual or has happened with additional reagent lots. In favour of the punctual problem is the use of the AAPA assays by other researchers without reporting any technical limitation[18–23]. It should be noted that caution and appropriate controls are always needed with this type of research assays that are not commercially available, nor approved for clinical use. Also, replication of the findings on other sample collections is required to be confident in the results.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

This need for prudence applies particularly to the ranking of the anti-AcOrn antibodies as more informative than the anti-CarP antibodies because the differences in performance were small or non-significant. Also, it will be important to analyse EA cohorts including patients with any joint swelling, in place of the two swollen joints required in our EA cohorts. Another limitation is the possible error in the assessment of the value of the AAPA introduced by the presence of RF in the 1987 RA classification criteria that we used after 2-years of follow-up. The weight of RF in that criteria is lower than in the 2010 criteria[4], but still, it was unclear if it was biasing the results. To assess this possibility, we compared the anti-AcOrn performance in the anti-CCP$^-$ and the RF$^-$ patients. A significant bias due to the presence of RF in the 1987 criteria should result in increased sensitivity for the anti-CCP$^-$ patients. Reassuringly, the contrary result was found: the sensitivity for RA patients was 8.4% and 17.4% for the anti-CCP$^-$ and RF$^-$ patients, respectively. Finally, implementation of the anti-AcOrn antibodies will require an additional laboratory test, but the added cost and labour will not be considered too cumbersome in the research setting that is the primary place of classification criteria.

In summary, the anti-AcOrn antibodies showed the best potential for improving the accuracy of the current RA classification among the analysed antibodies. This potential was demonstrated with a scoring system based on antibody concordance. The improvement affected specificity and accuracy and made redundant the stratification according to antibody concentrations. Regarding sensitivity, our analysis did not replicate the reported high sensitivity of the AAPA in the "seronegative" RA patients. In consequence, they were not as useful for improving the sensitivity of RA classification as suggested in previous reports. Although encouraging, our results should be taken with prudence until confirmed in other cohorts, particularly concerning the relative benefits achievable with anti-AcOrn and anti-CarP antibodies.

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 12 May 2020; Accepted: 18 September 2020
Published online: 06 November 2020

References

1. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **388**, 2023–2038 (2016).
2. 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).
3. Aggarwal, R. *et al.* Distinctions between diagnostic and classification criteria?. *Arthritis Care Res. (Hoboken)* **67**, 891–897 (2015).
4. Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315–324 (1988).
5. van der Helm-van Mil, A. H. & Huizinga, T. W. 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).
6. Radner, H., Neogi, T., Smolen, J. S. & Aletaha, D. Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 114–123 (2014).
7. van der Helm-van Mil, A. H. & Zink, A. What is rheumatoid arthritis? Considering consequences of changed classification criteria. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 315–317 (2017).
8. Boeters, D. M., Gaujoux-Viala, C., Constantin, A. & van der Helm-van Mil, A. H. M. The 2010 ACR/EULAR criteria are not sufficiently accurate in the early identification of autoantibody-negative rheumatoid arthritis: results from the Leiden-EAC and ESPOIR cohorts. *Semin. Arthritis Rheum.* **47**, 170–174 (2017).
9. van der Ven, M. *et al.* Do we need to lower the cut point of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for diagnosing rheumatoid arthritis?. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 636–639 (2016).
10. van der Linden, M. P. *et al.* Toward a data-driven evaluation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for rheumatoid arthritis: is it sensible to look at levels of rheumatoid factor?. *Arthritis Rheum.* **63**, 1190–1199 (2011).
11. Nordberg, L. B. *et al.* Patients with seronegative RA have more inflammatory activity compared with patients with seropositive RA in an inception cohort of DMARD-naïve patients classified according to the 2010 ACR/EULAR criteria. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 341–345 (2017).
12. Kaneko, Y., Kuwana, M., Kameda, H. & Takeuchi, T. Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)* **50**, 1268–1274 (2011).
13. Trouw, L. A. & Mahler, M. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 318–322 (2012).
14. Regueiro, C. *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. Ther.* **21**, 280 (2019).
15. van Dijk, B. T., Trouw, L. A., van der Helm-van Mil, A. H. M. & Huizinga, T. W. J. Substitution of the quantitative serological component in the 2010 criteria for RA with qualitative presence of three autoantibodies yields similar performance: response to the article by Regueiro et al. *Arthritis Res. Ther.* **22**, 85 (2020).
16. Regueiro, C. *et al.* Value of measuring anti-carbamylated protein antibodies for classification on early arthritis patients. *Sci. Rep.* **7**, 12023 (2017).
17. Boeters, D. M., Trouw, L. A., van der Helm-van Mil, A. H. M. & van Steenbergen, H. W. 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**, 94 (2018).
18. Juarez, M. *et al.* Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1099–1107 (2016).
19. Figueiredo, C. P. *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).
20. Studenic, P. *et al.* FRI0585 Prevalence of anti-acetylated protein antibodies in inflammatory arthritis, osteoarthritis, connective tissue diseases and its discriminative capacity as diagnostic marker for early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 816–817 (2018).
21. Studenic, P. *et al.* SAT0081 The diagnostic and predictive value of anti-acetylated peptide antibodies (AAPA) in rheumatoid arthritis patients starting their first DMARD treatment on methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 694 (2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

22. de Moel, E. C. *et al.* Baseline autoantibody profile in rheumatoid arthritis is associated with early treatment response but not long-term outcomes. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 33 (2018).
23. de Moel, E. C. *et al.* In rheumatoid arthritis, changes in autoantibody levels reflect intensity of immunosuppression, not subsequent treatment response. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 28 (2019).
24. Verheul, M. K. *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).
25. 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. USA* **108**, 17372–17377 (2011).
26. Montes, A. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies as a reproducible independent type of rheumatoid arthritis autoantibodies. *PLoS ONE* **11**, e0161141 (2016).
27. Avouac, J., Gossec, L. & Dougados, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 845–851 (2006).
28. Ioan-Facsinay, A. *et al.* Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum.* **58**, 3000–3008 (2008).
29. Terao, C. *et al.* Effects of smoking and shared epitope on the production of anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese adult population. *Arthritis Care Res. (Hoboken)* **66**, 1818–1827 (2014).
30. Ärlestig, L. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptides of IgG, IgA and IgM isotype and rheumatoid factor of IgM and IgA isotype are increased in unaffected members of multicase rheumatoid arthritis families from northern Sweden. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 825–829 (2012).
31. Gonzalez-Alvaro, I. *et al.* Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS ONE* **6**, e29492 (2011).
32. Orozco, G. *et al.* Auto-antibodies, HLA and PTPN22: susceptibility markers for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 138–141 (2008).
33. Anderson, D. R. & Burnham, K. *Model Selection and Multi-model Inference: A Practical Information-Theoretic Approach* (Springer-Verlag, Berlin, 2004).
34. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. https://www.R-project.org (2013).
35. The jamovi project. jamovi. https://www.jamovi.org (2019).
36. Micallef, L. & Rodgers, P. eulerAPE: drawing area-proportional 3-Venn diagrams using ellipses. *PLoS ONE* **9**, e101717 (2014).
37. 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**, 285 (2016).
38. Hedstrom, A. K., Ronnelid, J., Klareskog, L. & Alfredsson, L. Complex relationships of smoking, HLA-DRB1 genes, and serologic profiles in patients with early rheumatoid arthritis: update from a Swedish population-based case-control study. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1504–1511 (2019).
39. Regueiro, C. *et al.* A predominant involvement of the triple seropositive patients and others with rheumatoid factor in the association of smoking with rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* **10**, 3355 (2020).
40. Murphy, D., Mattey, D. & Hutchinson, D. Anti-citrullinated protein antibody positive rheumatoid arthritis is primarily determined by rheumatoid factor titre and the shared epitope rather than smoking per se. *PLoS ONE* **12**, e0180655 (2017).
41. Nijenhuis, S., Zendman, A. J. W., Vossenaar, E. R., Pruijn, G. J. M. & vanVenrooij, W. J. Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clin. Chim. Acta* **350**, 17–34 (2004).
42. Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6**, R142–R150 (2004).
43. Young, B. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D., Clark, C. J. & Hamblin, T. J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *BMJ* **2**, 97–99 (1979).
44. Sebbag, M. *et al.* The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Investig.* **95**, 2672–2679 (1995).
45. Lloyd, K. A. *et al.* Differential ACPA binding to nuclear antigens reveals a PAD-independent pathway and a distinct subset of acetylation cross-reactive autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* **9**, 3033 (2018).
46. Kissel, T. *et al.* Antibodies and B cells recognising citrullinated proteins display a broad cross-reactivity towards other post-translational modifications. *Ann. Rheum. Dis.* https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216499 (2020).
47. 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).

Acknowledgements

We thank the patients and the controls for their generous participation in the study, and Carmen Pena for her expert technical help. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) through grants [RD16/0012/0014 and PI17/01606 to AG; RD16/0012/0012 to AB; PI14/00442 and RD16/0012/0011 to IG-A]. These grants are partially financed by the European Regional Development Fund of the EU (FEDER). LRM was supported by Xunta de Galicia (Spain) through a Gain pre-doctoral fellowship. CR was supported by Ministerio de Educacion Cultura y Deporte (Spain) through a FPU pre-doctoral fellowship [FPU15/03434].

Author contributions

L.R-M., H.B., A.B., I.G-A. and A.G. contributed to study conception and design. L.R-M. performed laboratory determinations. C.R., D.P., A.T-M., A.M.O., A.V., A.M-F., A.V., A.M-F., A.B., I.G-A. provided patients and clinical and laboratory data. H.B. provided critical reagents and protocols. L.R-M. and A.G. analysed the results and wrote the first draft of the manuscript. All authors were involved in revising critically the manuscript for important intellectual content. All authors approved the final version to be published. All authors have agreed both to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Funding

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. There has been no financial support from commercial sources.

Competing interests

Holger Bang is employee of the diagnostic company Orgentec Diagnostika. Alejandro Balsa has received grant/research support from: Abbvie, Pfizer, Novartis, BMS, Nordic, Sanofi; Consultant for: Abbvie, Pfizer, Novartis, BMS, Nordic, Sanofi, Sandoz, Lilly; Paid instructor for: Pfizer; Speakers bureau: Pfizer, Novartis, UCB, Nordic, Sanofi, Sandoz, Lilly. Isidoro Gonzalez-Alvaro has received personal fees from Lilly and Sanofi; personal fees and non-financial support from BMS, Abbvie, and Roche Laboratories; non-financial support from MSD, Pfizer and Novartis. Antonio Gonzalez has received research support and speaker fees from BMS. The other authors declare no financial interests that could create a potential conflict of interest or the appearance of a conflict of interest regarding this work.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-73919-y.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

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

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonómico 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 estúdio: 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

galicia

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

DE ASIS A COMPOSTELA
1214 · 2014

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es

galicia

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

Las modificaciones postraduccionales (PTM) de proteínas son autoantígenos de la artritis reumatoide como demuestra la presencia de anticuerpos frente a proteínas citrulinadas, carbamiladas y péptidos acetilados. Sin embargo, son muchas las incógnitas en torno al patrón de proteínas citrulinadas, la utilidad de los anticuerpos como biomarcadores y la extensión de las PTM específicas de la enfermedad. Nuestros hallazgos refuerzan la relevancia de las histonas como antígenos citrulinados, identifican como biomarcadores útiles para la clasificación de pacientes a los anticuerpos anti-ornitina acetilada, pero no a los anticuerpos frente a aductos oxidados con malondialdehído y muestran que los anticuerpos frente a proteínas carboniladas, nitradas y homocisteiniladas carecen de relevancia en la artritis reumatoide.