

**Eficacia de los marcadores bioquímicos para
el diagnóstico y pronóstico de la Artritis
Reumatoide en pacientes que acuden a una
consulta de atención especializada**

José Luis García de Veas Silva



**Tesis Doctoral
Sevilla 2015**



**Eficacia de los marcadores bioquímicos para el
diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide en
pacientes que acuden a una consulta de atención
especializada**

José Luis García de Veas Silva

**Tesis Doctoral
Sevilla 2015**



ISBN 978-84-608-1897-7

© José Luis García de Veas Silva, Septiembre 2015, Sevilla

**Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular
Programa de Doctorado de Bioquímica Médica**

Eficacia de los marcadores bioquímicos para el diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide en pacientes que acuden a una consulta de atención especializada

**Trabajo realizado para optar al grado de Doctor en Químicas
por el Licenciado José Luis García de Veas Silva**

Directoras de Tesis

**Dra. Concepción González Rodríguez
Dra. Blanca Hernández Cruz**

Tutor de Tesis

Dr. Raimundo Goberna Ortiz



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



DOÑA CONCEPCIÓN GONZÁLEZ RODRIGUEZ, Facultativa Especialista de Área en la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla hace constar que el trabajo titulado: **“Eficacia de los marcadores bioquímicos para el diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide en pacientes que acuden a una consulta de atención especializada”**, ha sido realizado por JOSÉ LUIS GARCÍA DE VEAS SILVA bajo mi dirección, en la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de la UGC Intercentro de Laboratorio de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocio de Sevilla.

A mi juicio reúne los méritos suficientes para ser presentado como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Sevilla a 1 de Julio de dos mil quince.

Fdo. Dra. Concepción González Rodríguez

1 de Julio de 2015, Sevilla



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



DOÑA BLANCA HERNÁNDEZ CRUZ, Facultativa Especialista de Área en la Unidad de Gestión Clínica de Reumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla hace constar que el trabajo titulado: **“Eficacia de los marcadores bioquímicos para el diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide en pacientes que acuden a una consulta de atención especializada”**, ha sido realizado por JOSÉ LUIS GARCÍA DE VEAS SILVA bajo mi dirección, en la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de la UGC Intercentro de Laboratorio de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocio de Sevilla.

A mi juicio reúne los méritos suficientes para ser presentado como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Sevilla a 1 de Julio de dos mil quince.

Fdo. Dra. Blanca Hernández Cruz

1 de Julio de 2015, Sevilla



DON RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla hace constar que el trabajo titulado: **“Eficacia de los marcadores bioquímicos para el diagnóstico y pronóstico de la Artritis Reumatoide en pacientes que acuden a una consulta de atención especializada”**, ha sido realizado por JOSÉ LUIS GARCÍA DE VEAS SILVA bajo mi tutela, en la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de la UGC Intercentro de Laboratorio de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocio de Sevilla.

A mi juicio reúne los méritos suficientes para ser presentado como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Sevilla a 1 de Julio de dos mil quince.

Fdo. Dr. Raimundo Goberna Ortiz

1 de Julio de 2015, Sevilla

A mis padres, por darme más de lo que nunca podré agradecer.

**A Blanca y Concha, estímulos fundamentales de este trabajo,
gracias por la confianza depositada en mí y la dedicación sin límites.**

A los pacientes con Artritis Reumatoide, causa y fin de esta tesis.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi familia, a quienes debo lo que soy, por enseñarme el valor del trabajo y la humildad y por su confianza y apoyo. Especialmente a mis padres que me estimularon a superarme y que son un ejemplo de esfuerzo y dedicación al trabajo.

A las Dras. Concha González y Blanca Hernández por confiar en este proyecto y darme la oportunidad de realizarlo bajo su dirección, por enseñarme la importancia del rigor en el trabajo y aconsejarme profesionalmente. También por inculcarme el interés por la Autoinmunidad y la Bioestadística, sin ellas no hubiera sido posible este trabajo ni mi desarrollo profesional en el área de la Autoinmunidad.

Al Dr. Raimundo Goberna por haberme dado la posibilidad de formarme en la Unidad de Bioquímica Clínica y por transmitirme su sentido de la responsabilidad y disciplina durante mi periodo de formación, por su gran interés en la carrera investigadora de los residentes del laboratorio y por las labores de tutor de este trabajo de investigación.

Al Dr. Víctor Sánchez Margalet por abrimme las puertas al campo de la investigación clínica, guiarme y ayudarme en mis inicios en la investigación con el estudio realizado sobre el lavado broncoalveolar.

A todos los facultativos de la Unidad de Bioquímica Clínica, por enseñarme y compartir sus conocimientos y destrezas en el ámbito asistencial, científico y docente. Con ellos inicie mis primeros pasos en el mundo del laboratorio clínico. En especial a la Dra. Carmen Bermudo por introducirme en el apasionante mundo de las gammapatías monoclonales; a los Dres. Antonio Barco y Félix López Elorza por todos los conocimientos transmitidos en el área de marcadores tumorales y a la Dra. Pilar Sánchez por la excelente rotación en el laboratorio de hormonas y marcadores tumorales. Todos ellos son ejemplo de esfuerzo y del buen trabajo.

A la Dra. Carmen Bermudo también por su constante interés, apoyo e insistencia en acabar esta tesis, por proponerme varios proyectos, casos clínicos y estudios de investigación. Gracias por enseñarme a publicar, aconsejarme, exigirme y superarme cada vez más en el trabajo.

A mis compañeros residentes durante mi formación en Bioquímica Clínica, por su ayuda, consejos y compañía en esa etapa, especialmente a Silvia, Vicky, Berta, Rufino y Carmen. A Elvira y Manu por enseñarme fisiopatología en mis primeros meses en el hospital y hacerme más fácil la adquisición de conocimientos médicos.

A las técnicas del Laboratorio de Urgencias por la ayuda que nos han prestado a los residentes en las guardias día a día, haciéndonos más llevadero el trabajo y permitiéndome aprovechar ratos para recopilar datos de pacientes para la tesis.

A los miembros de la Unidad de Reumatología por su apoyo técnico y científico en la elaboración de la presente tesis. En especial a Nadia y Victoria por atender todas mis consultas que tuve al inicio de este trabajo. A Nadia y Manu por sus estudios previos a mi tesis realizados sobre Artritis Reumatoide Precoz que han servido de base para la posterior realización de este trabajo.

Al numeroso personal de la Unidad de Bioquímica Clínica por haber contribuido con su trabajo al desarrollo del mío y especialmente, a los integrantes del Laboratorio de Autoinmunidad.

A los pacientes incluidos en este estudio ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Por último, a todos los compañeros del Hospital Universitario Virgen Macarena, y a todos aquellos que aunque no aparezcan aquí mencionados, han contribuido de una forma u otra a que este trabajo se haya hecho realidad, a los que en algún momento de la elaboración de esta tesis hicieron su aportación.

A todos ellos, mi mayor reconocimiento y gratitud.

Tabla de Contenidos

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
FIGURAS	9
TABLAS	13
<u>PARTE I</u> INTRODUCCIÓN	17
1 Artritis Reumatoide	19
1.1 Epidemiología y morbimortalidad	19
1.2 Patogénesis	20
1.3 Manifestaciones clínicas	23
1.4 Diagnóstico	26
1.5 Marcadores de inflamación	30
1.6 Evolución clínica y pronóstico	32
1.7 Tratamiento	34
2 Etiología de la Artritis Reumatoide	37
2.1 Factores genéticos	37
2.1.1 Función de los genes HLA	38
2.1.2 Hipótesis del Epitopo Compartido	39
2.1.3 Relevancia clínica del Epitopo Compartido	43
2.1.4 Implicaciones mecánísticas del Epitopo Compartido	44
2.1.5 Hipótesis del epitopo protector o modelo RAP (RA-protection)	45
2.1.6 Otros genes asociados a la Artritis Reumatoide	47
2.1.7 Estudios de ligamiento	47
2.1.8 Estudios de asociación de genes candidatos y genoma completo	48
2.1.9 Genes no HLA asociados a la Artritis Reumatoide	49
2.2 Factores Ambientales	52
2.2.1 Género y factores hormonales	52
2.2.2 Factores dietéticos	53
2.2.3 Consumo de café	54
2.2.4 Consumo de alcohol	54
2.2.5 Exposición a agentes ocupacionales	55
2.2.6 Factores socioeconómicos	55
2.2.7 Agentes infecciosos	56
2.2.8 Hábito Tabáquico	58
2.2.8.1 Hábito Tabáquico y Artritis Reumatoide	58
2.2.8.2 Hábito Tabáquico y severidad de la enfermedad	60
2.2.8.3 Hábito Tabáquico, factor reumatoide y epitopo compartido	61

3 Citrulinización. Hipótesis del epitopo compartido citrulinado	63
3.1 Citrulinización	63
3.2 Hipótesis del Epitopo Compartido Citrulinado	65
3.3 Hábito tabáquico, epitopo compartido y citrulinización	67
3.4 Fenotipos clínicos de la enfermedad	70
3.5 Periodontitis y citrulinización	71
4 Autoanticuerpos en Artritis Reumatoide	74
4.1 Factor Reumatoide	74
4.1.1 Prevalencia del factor reumatoide	75
4.1.2 Utilidad clínica del factor reumatoide	77
4.2 Anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados	78
4.2.1 Anticuerpos anti-factor perinuclear (AFP)	79
4.2.2 Anticuerpos anti-queratina (AKA)	80
4.2.3 Anticuerpos anti-filagrina (AFA)	81
4.2.4 Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico (anti-CCP)	82
4.2.5 Utilidad clínica de los anti-CCP	84
1) Diagnóstico de AR	84
2) Diferenciar la AR de otras patologías	85
3) Diagnóstico de AR precoz o de inicio reciente	87
4) Pronóstico de la AR y predicción de enfermedad severa	89
5) Monitorización de las intervenciones terapéuticas	91
4.2.6 Anticuerpos anti-vimentina citrulinada (anti-Sa)	93
4.2.7 Anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV)	94
4.3 Otros anticuerpos en Artritis Reumatoide	95
4.3.1 Anticuerpos anti-ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2	96
4.3.2 Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	96
4.3.3 Anticuerpos anti-alfa enolasa	97
4.3.4 Anticuerpos anti-glucosa-6-fosfato isomerasa (anti-GPI)	97
4.3.5 Anticuerpos anti-alfa enolasa péptido-1 citrulinado (anti-CEP)	97
4.3.6 Anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL)	97
4.3.7 Anticuerpos antinucleares (ANA)	97
<u>PARTE II HIPÓTESIS & OBJETIVOS</u>	99
1 Justificación	101
2 Hipótesis del estudio	103
3 Objetivos del estudio	105
3.1 Objetivo general	105
3.2 Objetivos específicos	105

<u>PARTE III</u>	<u>MATERIALES & MÉTODOS</u>	107
1	Población y ámbito de estudio	109
2	Diseño del estudio	109
3	Periodos de tiempo	110
4	Aspectos éticos de la investigación	111
5	Pacientes y controles. Criterios de inclusión y exclusión	111
	5.1 Pacientes	111
	5.2 Controles sanos	112
6	Diagnóstico de los pacientes y grupos de estudio	113
7	Evaluación de los pacientes por el reumatólogo	114
	7.1 Parámetros que miden el grado de actividad inflamatoria	115
	7.2 Evaluación de la discapacidad del paciente	119
	7.3 Evaluación del daño estructural	119
8	Metodología analítica	120
	8.1 Obtención de las muestras biológicas	120
	8.2 Determinación de anticuerpos anti-CCP	120
	8.3 Determinación del Factor Reumatoide	124
	8.4 Determinación del Epitopo Compartido	125
	8.5 Determinación de la Proteína C Reactiva	126
	8.6 Determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular	126
	8.7 Determinación de Anticuerpos Antinucleares	127
9	Variables del estudio	131
	9.1 Definición de las variables del estudio	131
	9.2 Planificación de las variables durante el estudio	136
10	Análisis estadístico	137
11	Plan de trabajo y cronograma	142
<u>PARTE IV</u>	<u>RESULTADOS</u>	145
1	Características demográficas	147
2	Descripción de variables clínicas	151
3	Descripción de variables bioquímicas	153
4	Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y FR	158
5	Valor diagnóstico de los biomarcadores en una consulta de Atención Primaria	160

6 Valor diagnóstico de los biomarcadores en una consulta especializada de Artritis Precoz	163
7 Asociación entre el epitopo compartido y los anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con Artritis Reumatoide	165
8 Asociación entre el hábito tabáquico y los anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con Artritis Reumatoide	169
9 Interacción entre el hábito tabáquico y el epitopo compartido sobre los anticuerpos en los pacientes con Artritis Reumatoide	175
10 Valor pronóstico de los anticuerpos anti-CCP	185
11 Valor pronóstico del Factor Reumatoide	189
12 Valor pronóstico del Epitopo Compartido	194
<u>PARTE V DISCUSIÓN</u>	199
<u>PARTE VI CONCLUSIONES</u>	229
<u>PARTE VII ANEXOS</u>	233
Anexo 1: Aprobación del proyecto de investigación	235
Anexo 2: Consentimiento informado	239
Anexo 3: Hoja de recogida de datos	245
Anexo 4: Cuestionario HAQ	249
Anexo 5: Determinación del Epitopo Compartido	255
Anexo 6: Determinación de ANAs por IFI	269
Anexo 7: Tablas de datos del estudio pronóstico	279
Anexo 8: Comunicaciones a Congresos y Jornadas	287
<u>PARTE VIII BIBLIOGRAFÍA</u>	291

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

25[OH]D	25-hidroxivitamina D
AC	Artritis por cristales
ACR	American College of Rheumatology
ACPA	Anticuerpos contra proteínas y/o péptidos citrulinados
AFA	Anticuerpos anti-filagrina
AI	Artritis indiferenciada
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AKA	Anticuerpos anti-queratina
ANAs	Anticuerpos antinucleares ó anticelulares
ANCAs	Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos
ANOVA	Análisis de la varianza
Anti-CCP	Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico
Anti-CCP1	Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico de primera generación
Anti-CCP2	Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico de segunda generación
Anti-CCP3	Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico de tercera generación
Anti-CEP	Anticuerpos anti-alfa enolasa péptido-1 citrulinado
Anti-DNA	Anticuerpos anti-DNA de doble cadena
Anti-GPI	Anticuerpos anti-glucosa-6-fosfato isomerasa
Anti-MCV	Anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada
Anti-RA33	Anticuerpos anti-ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2
Anti-Sa	Anticuerpos anti-vimentina citrulinada
Anti-TNF	Fármacos inhibidores del factor de necrosis tumoral
AFP	Anticuerpos anti-factor perinuclear
aPL	Anticuerpos anti-fosfolípidos
AR	Artritis Reumatoide
AT	Artromialgias no inflamatorias
AUC	Área bajo la curva (Area under curve)
BAL	Lavado broncoalveolar
CCP	Péptido citrulinado cíclico
CCP1	Péptido citrulinado cíclico de primera generación
CCP2	Péptido citrulinado cíclico de segunda generación
CCP3	Péptido citrulinado cíclico de tercera generación
CPA	Péptidos citrulinados
COMP	Proteína oligomérica de matriz del cartílago
COXIB	Inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2
CV	Coefficientes de variación
CTLA4	Antígeno linfocitario citotóxico 4
DAS	Disease Activity Score sobre 44 articulaciones y basado en la VSG
DAS-PCR	DAS calculado con la formulación basada en la PCR
DAS28	Disease Activity Score sobre 28 articulaciones y basado en la VSG

DAS28-PCR	DAS28 calculado con la formulación basada en la PCR
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
E	Especificidad
EA	Espondilitis anquilosante
EC	Epítipo compartido
EGP	Evaluación global de la enfermedad por el paciente
EGM	Evaluación global de la enfermedad por el médico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EITC	Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conectivo
EPISER	Estudio de prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española
ET	Error típico
EULAR	European League Against Rheumatism
EVA	Evaluación del dolor por el paciente
Fab	Fragmento de unión al antígeno de las inmunoglobulinas
FARMES	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
FR	Factor reumatoide
GGT	Gamma glutamil transferasa
GOT	Transaminasa glutámico oxalacético
GPT	Transaminasa glutámico pirúvico
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo (genome wide association studies)
HA	Hipotiroidismo autoinmune
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HLA	Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen)
HLA-DRB1	Región génica codificante de la cadena beta del MHC humano de clase II
hnRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HSPs	Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins)
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
ILs	Interleucinas
IFN-γ	Interferon gamma
IRF-5	Factor regulador del interferon 5
IT	Índice de Tabaquismo
LES	Lupus eritematoso sistémico
LFN	Leflunomida
LR+	Razón de verosimilitud positiva (Likelihood ratio positivo)

LR-	Razón de verosimilitud negativa (Likelihood ratio negativo)
Me (IQR)	Mediana (Rango Intercuartílico)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad humano
MMPs	Metaloproteinasas
MTX	Metotretaxo
NAD	Recuento o número de articulaciones dolorosas basado en 28 articulaciones
NAI	Recuento o número de articulaciones inflamadas basado en 28 articulaciones
NSC	Normal Scores Transformation
OPGL	Ligando de unión a la Osteoprotegerina
OR	Odd Ratio
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAD	Peptidil arginil desaminasa
PADI4	Peptidil arginil desaminasa tipo 4
paq.	paquetes
PCR	Proteína C reactiva
PPAD	Peptidil arginil desaminasa bacteriana
PSA	Artritis psoriásica
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa no receptor 22
RANKL	Ligando de unión al Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa-B
RAP	Modelo de protección de la AR (RA-protection)
ROC	Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic)
RR	Riesgo relativo
RUNX1	Factor de transcripción relacionado con runt 1
S	Sensibilidad
SER	Sociedad Española de Reumatología
SLC22A4	Transportador soluble de cationes orgánicos 4
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SS	Síndrome de Sjögren
STAT4	Transductor de señal y activador de la transcripción tipo 4
T2T	Treat to target
TCR	Receptor de células T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
TRAF1	Factor 1 asociado al receptor del TNF
VHC	Virus de la hepatitis C
VSG	Velocidad de sedimentación globular
VN	Valores normales o de referencia
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WTCCC	Welcome Trust Case Control Consortium

FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización de citoquinas implicadas en la AR

Figura 2. Patogénesis de la AR

Figura 3. Afectación simétrica de articulaciones

Figura 4. Radiografías anteroposterior de manos pacientes con AR

Figura 5. Manifestaciones extraarticulares de la AR

Figura 6. Curso de la AR

Figura 7. Progresión radiográfica de la AR

Figura 8. Tipos de agente biológicos empleados en la terapia para la AR

Figura 9. Presentación de un antígeno y activación de linfocitos T CD4

Figura 10. Mapa genético de la región HLA (Human Leukocyte Antigen).

Figura 11. Localización del “epitopo compartido” en la molécula HLA de clase II y secuencias de aminoácidos que codifican para el epitopo compartido

Figura 12. Hipótesis del EC protector

Figura 13. Estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en AR

Figura 14. Estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en AR

Figura 15. Teoría del mimetismo molecular

Figura 16. Índice de tabaquismo

Figura 17. Conversión de la arginina a citrulina por acción de la peptidilarginil desaminasa (PAD)

Figura 18. Hipótesis etiológica del modelo de desarrollo de una AR con anti-CCP positivos desde un estado pre-enfermedad a una poliartritis crónica que cumple los criterios de AR

Figura 19. Riesgo relativo (RR) para el desarrollo de AR en fumadores actuales con diferentes número de copias de alelos del EC comparado con no fumadores

Figura 20. Clasificación de los fenotipos clínicos de la AR según la presencia de anti-CCP

Figura 21. Enfermedad periodontal agresiva

Figura 22. Hipótesis etiológica para *P. gingivalis* y citrulinización y su participación en la AR

Figura 23. Isotipos de Factor Reumatoide

- Figura 24.** Detección de anticuerpos anti-factor perinuclear mediante IFI
- Figura 25.** Detección de anticuerpos anti-queratina mediante IFI
- Figura 26.** Péptido citrulinado cíclico de primera generación (CCP1)
- Figura 27.** Actividad de la enfermedad medida durante tres años de seguimiento en pacientes con AR temprana
- Figura 28.** Grupos de pacientes incluidos en el estudio
- Figura 29.** Homúnculos empleados para el recuento de articulaciones dolorosas e inflamadas
- Figura 30.** Escala empleada para la evaluación del dolor por el paciente, la evaluación global de la enfermedad por el paciente y por el médico
- Figura 31.** Clasificación de los sujetos incluidos en el estudio
- Figura 32.** Índice de tabaquismo en los sujetos fumadores de cada grupo estudiado según el hábito tabáquico
- Figura 33.** Manifestaciones extraarticulares presentes en los pacientes en la visita basal
- Figura 34.** Patrones por IFI observados en los pacientes con ANAs positivos
- Figura 35.** Frecuencia de los genotipos del EC en los distintos grupos
- Figura 36.** Frecuencia del carácter heterocigoto y homocigoto del EC
- Figura 37.** Frecuencia de las combinaciones alélicas del epitopo compartido en los grupos AR, NOAR y CONTROL
- Figura 38.** Porcentaje de anticuerpos anti-CCP y FR positivos en cada una de las entidades clínicas que se asocian al grupo NOAR.
- Figura 39.** Curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL
- Figura 40.** Curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR
- Figura 41.** Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el EC
- Figura 42.** Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el EC
- Figura 43.** Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico
- Figura 44.** Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico
- Figura 45.** Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el índice de tabaquismo.

Figura 46. Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el índice de tabaquismo

Figura 47. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el hábito tabáquico en los pacientes diagnosticados de AR y con EC positivo

Figura 48. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el hábito tabáquico en los pacientes diagnosticados de AR y con EC negativo

Figura 49. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el índice de tabaquismo en los pacientes diagnosticados de AR y con EC negativo

Figura 50. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el índice de tabaquismo en los pacientes diagnosticados de AR y con EC positivo

Figura 51. Niveles de anti-CCP (U/mL) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido y hábito tabáquico

Figura 52. Niveles de FR (UI/ml) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido y hábito tabáquico

Figura 53. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento

Figura 54. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (<120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL)

Figura 55. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (<120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL)

Figura 56. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento

Figura 57. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (<60 UI/mL) y con FR positivo (>60 UI/mL)

Figura 58. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (<60 UI/mL) y con FR positivo (>60 UI/mL)

Figura 59. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento

Figura 60. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con EC negativo y positivo

Figura 61. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con EC negativo y positivo

Figura 62. Tira de reacción utilizada en la hibridación reversa

Figura 63. Protocolo de actuación ante un paciente con sospecha clínica de enfermedad autoinmune sistémica.

Figura 64. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento

Figura 65. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (<40 U/mL) y con anti-CCP positivo (>40 U/mL)

Figura 66. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (<40 U/mL) y con anti-CCP positivo (>40 U/mL)

Figura 67. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento

Figura 68. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los con FR negativo (<20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL)

Figura 69. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (<20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL)

TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación para la AR del American College of Rheumatology (1987)

Tabla 2. Criterios de clasificación para AR de 2010

Tabla 3. Clasificación de los alelos HLA-DRB1 implicados en la susceptibilidad a la AR

Tabla 4. Riesgo específico para los alelos del EC HLA-DRB1 para AR severa relativo a DRX/DRX calculado usando la frecuencia observada en controles

Tabla 5. Distribución de los alelos del EC y positividad para los anti-CCP

Tabla 6. Prevalencia del factor reumatoide en enfermedades reumáticas y no reumáticas

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-CCP y del FR IgM

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad del ensayo CCP2

Tabla 9. Prevalencia de los anti-CCP en presencia de otras enfermedades reumáticas y no reumáticas.

Tabla 10. Variables del modelo predictivo de una artritis persistente erosiva

Tabla 11. Características de estudios longitudinales sobre los niveles de FR y anti-CCP durante el tratamiento con inhibidores del TNF- α

Tabla 12. Clasificación de la actividad inflamatoria del paciente según la definición original y la definición actual recomendada para el índice de actividad DAS28.

Tabla 13. Definición de las variables incluidas en el estudio

Tabla 14. Planificación de las variables incluidas en el estudio

Tabla 15. Cronograma de trabajo

Tabla 16. Características demográficas de los pacientes en la visita basal

Tabla 17. Índice de tabaquismo en los sujetos fumadores de cada grupo estudiado según el hábito tabáquico

Tabla 18. Características clínicas de los pacientes en la visita basal

Tabla 19. Variables bioquímicas de los pacientes en la visita basal

Tabla 20. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide en los pacientes con AR

Tabla 21. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide en los pacientes del grupo NOAR

Tabla 22. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LR+, LR- y OR diagnóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes del grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL

Tabla 23. Área bajo la curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL

Tabla 24. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LR+, LR- y OR diagnóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes del grupo AR respecto al grupo NOAR

Tabla 25. Área bajo la curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR

Tabla 26. Asociación entre el epitopo compartido y la presencia de anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con AR

Tabla 27. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el EC

Tabla 28. Asociación entre el hábito tabáquico y la presencia de anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con AR

Tabla 29. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico

Tabla 30. Asociación entre el índice de tabaquismo y la presencia de anti-CCP y FR en los pacientes con AR

Tabla 31. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el consumo de tabaco

Tabla 32. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el hábito tabáquico en los pacientes con AR estratificado según el EC

Tabla 33. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el índice de tabaquismo en los pacientes con AR estratificado según el EC

Tabla 34. Análisis multivariante por regresión logística de las variables que influyen independientemente en la presencia de anticuerpos anti-CCP en los pacientes con AR

Tabla 35. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según la combinación de las variables epitopo compartido y hábito tabáquico

Tabla 36. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según la combinación de las variables epitopo compartido y índice de tabaquismo

Tabla 37. Modelo lineal general univariante para el estudio de la interacción entre el epitopo compartido y el hábito tabáquico sobre los niveles de anti-CCP y de FR

Tabla 38. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para los anticuerpos anti-CCP

Tabla 39. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con anti-CCP negativo (<120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL) durante los 3 años de seguimiento

Tabla 40. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para el FR

Tabla 41. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con FR negativo (<60 UI/mL) y con FR positivo (>60 UI/mL) durante los 3 años de seguimiento

Tabla 42. Características basales de los pacientes con AR estratificados según el EC

Tabla 43. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con EC negativo y con EC positivo durante los 3 años de seguimiento

Tabla 44. Especificidad de los PN MIX

Tabla 45. Preparación de los reactivos para la determinación del epitopo compartido

Tabla 46. Especificidad de los PN MIX

Tabla 47. Protocolo para la SSP-PCR

Tabla 48. Localización y patrón de fluorescencia asociados a cada uno de los antígenos.

Tabla 49. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para los anticuerpos anti-CCP

Tabla 50. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con anti-CCP negativo (<40 U/mL) y con anti-CCP positivo (>40 >U/mL) durante los 3 años de seguimiento

Tabla 51. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para el FR

Tabla 52. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con FR negativo (<20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL) durante los 3 años de seguimiento



I

Introducción

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una inflamación crónica de las articulaciones sinoviales. Las manifestaciones de la inflamación son el dolor, el aumento del volumen, el eritema y la rigidez matinal. La sinovitis inflamatoria afecta habitualmente a las articulaciones diartrodiales con una distribución simétrica. La inflamación sinovial produce la destrucción del cartílago con erosiones óseas y deformidades articulares características en fases posteriores. Esta destrucción de las articulaciones contribuye a un deterioro considerable de la función física.

1.1 Epidemiología y morbimortalidad

La prevalencia de la AR en la población mundial se sitúa alrededor del 0,5-1% con una frecuencia en mujeres tres veces mayor que en hombres. También se ha observado una mayor frecuencia en población urbana frente a rural. La prevalencia más alta se encuentran en tribus de indios americanos (>1,2%) y en grupos de esquimales. Por el lado contrario, la prevalencia más bajas se han descrito en los países asiáticos y africanos.

En España, el estudio EPISER estimó una prevalencia de la AR en mayores de 20 años del 0,5% (IC95% de 0,3-0,9). La relación entre mujeres/hombres y entre áreas urbanas/rurales fue de 4:1 en ambos casos. El pico de frecuencia se presentó entre los 40-60 años¹.

Además, la AR produce una reducción de la esperanza de vida con un incremento de mortalidad asociados a enfermedades cardiovasculares (principalmente enfermedad coronaria), respiratorias, infecciosas y neoplasias malignas. Los enfermos con AR tienen un incremento en mortalidad de 2-3 veces mayor que la población sin AR de edad y sexo similar^{2,3}.

1.2 Patogénesis

Aunque la patogénesis de la enfermedad no está esclarecida en su totalidad, existen factores genéticos y ambientales que predisponen a su desarrollo. La AR es resultado de la activación de células T y B autorreactivas que actúan conjuntamente y producen una inflamación sinovial con infiltración celular junto a un proceso de remodelado y destrucción ósea. El proceso de destrucción ósea y del cartílago articular en la AR se resume brevemente a continuación⁴⁻⁶:

Las células T CD4+ activadas como respuesta a un antígeno extraño estimulan a monocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales para producir las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α a través de procesos de señalización intercelular por medio de antígenos de superficie CD69 y CD11 así como a través de la liberación de mediadores solubles como interferon- γ e IL-17. Las citoquinas claves que intervienen en el proceso inflamatorio de la enfermedad son IL-1, IL-6 y TNF- α . La IL-1 y el TNF- α estimulan a los fibroblastos sinoviales, osteoclastos y condrocitos que liberan MMPs y diversas sustancias cuyo fin último es el daño del tejido conectivo de la matriz extracelular de las articulaciones. Estos son los principales mediadores del daño articular en la AR.

Además, las células T CD4+ expresan los ligandos RANKL y OPGL que estimulan la osteoclastogénesis produciendo la degradación del hueso. Los linfocitos, los macrófagos y los fibroblastos activados pueden estimular también la angiogénesis; esto explicaría la vascularización incrementada encontrada en el tejido sinovial de pacientes con AR. Las células endoteliales en el tejido sinovial se activan y expresan moléculas de adhesión que promueven el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos hacia las articulaciones. Los neutrófilos liberan elastasa y proteasa que degradan los proteoglicanos en la capa superficial del cartílago. La erosión temprana del cartílago y del hueso está asociada a la formación de un “pannus” proliferativo, es decir, tejido inflamatorio de granulación vascular de origen sinovial que recubre el cartílago y que está compuesto por células sinoviales proliferadas, pequeños vasos sanguíneos, proteínas estructurales, proteoglicanos y células inflamatorias. El pannus causa destrucción del tejido articular situado en la zona de unión entre la membrana sinovial y el cartílago produciendo lo que se conoce como erosiones articulares. Las células T CD4+ activadas también estimulan a las células B para producir inmunoglobulinas entre las que se incluyen anticuerpos contra proteínas y/o péptidos

citrulinados y el FR. El rol patogénico exacto del FR es desconocido pero parece estar implicado en la activación del complemento a través de la formación de inmunocomplejos (Figura 1).

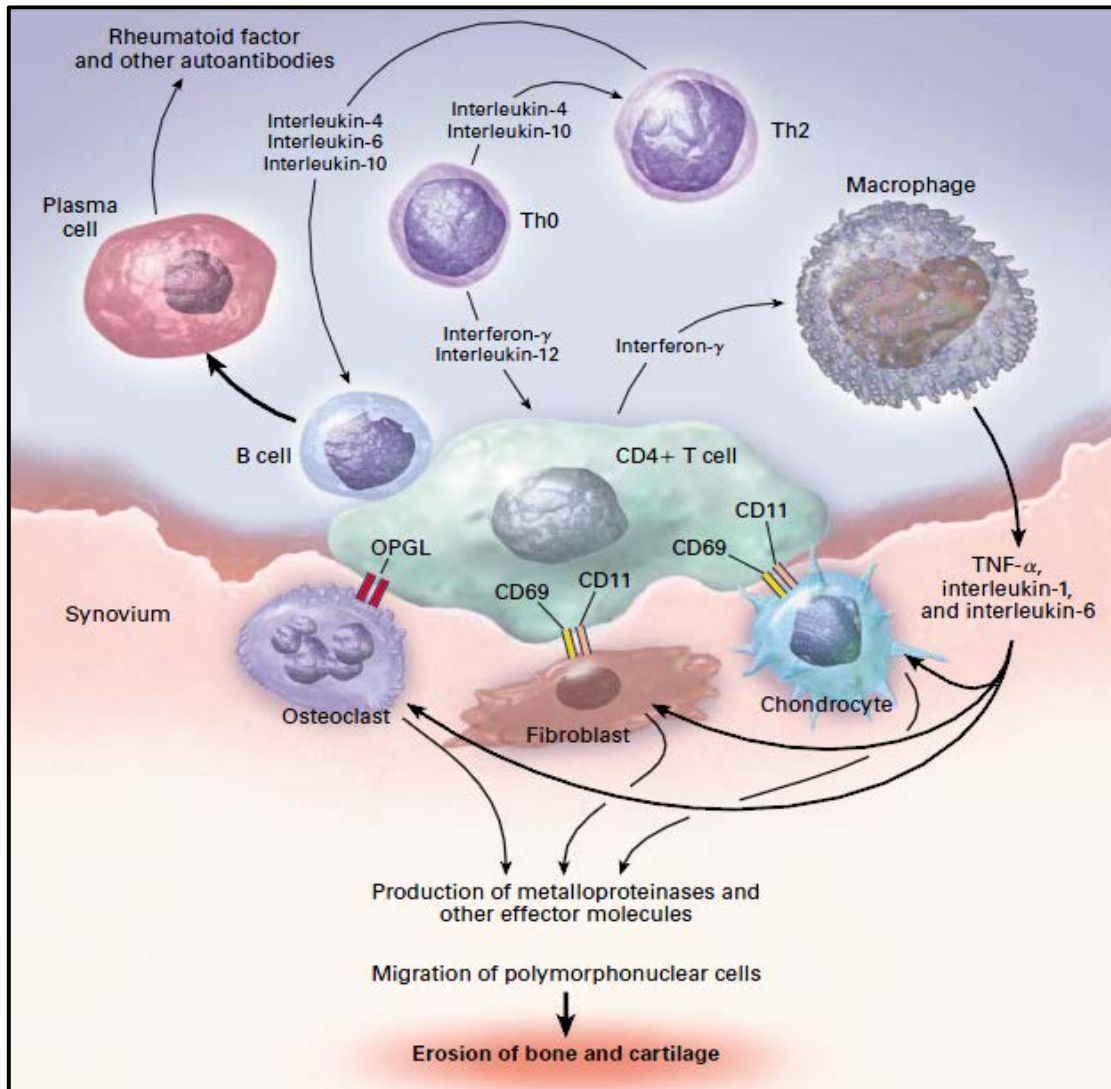


Figura 1. Vías de señalización de citoquinas implicadas en la AR. Se muestran los principales tipos de células y vías de señalización que están implicadas en la destrucción articular medida por TNF- α y IL-1 en AR. Imagen tomada de Choy y cols⁴.

De acuerdo a esos eventos, la AR se puede dividir en dos etapas que corresponden a la AR temprana y establecida. En la articulación normal, el tejido sinovial está formado por la membrana sinovial y el tejido conectivo subyacente. Las células sinoviales se designan de tipo A (sinoviocitos similares a macrófagos) y de tipo B (sinoviocitos similares a fibroblastos). En la AR temprana, la membrana sinovial se hace más gruesa debido a la hiperplasia e hipertrofia de las células sinoviales. Las células T (principalmente CD4+) y las células B (algunas de las cuales se convertirán en células plasmáticas) infiltran la membrana sinovial. Estas células también se

encuentran en el líquido sinovial junto con un gran número de neutrófilos. En estas etapas iniciales de la AR, la membrana sinovial empieza a invadir el cartílago. En la AR establecida, las células sinoviales proliferan en número y estado de activación. El pannus proliferativo se comporta como una tumoración localmente invasiva que destruye el cartílago y el hueso subcondral. El pannus consiste de sinoviocitos de tipo A y B junto a células plasmáticas⁴. La patogénesis de la AR se resume en la Figura 2.

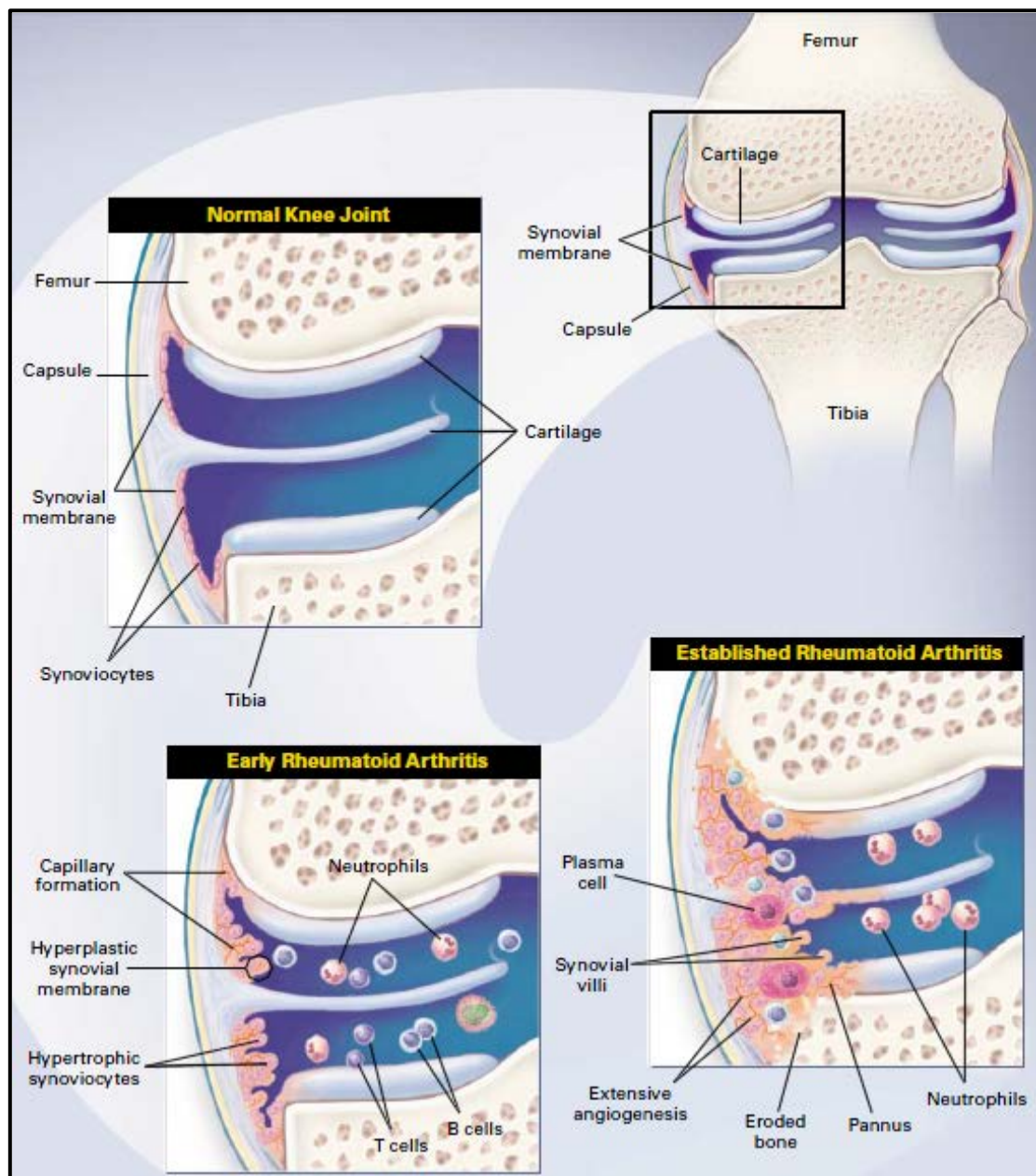


Figura 2. Patogénesis de la AR. Se muestran los cambios que tienen lugar en una articulación de un paciente con AR. Imagen tomada de Choy y cols⁴.

1.3 Manifestaciones clínicas

La AR es una enfermedad que se manifiesta como poliartritis de pequeñas articulaciones y/o grandes articulaciones. Esta afectación de las grandes y pequeñas articulaciones es de forma simétrica en la mayoría de casos (Figura 3). Las manifestaciones articulares básicas se caracterizan por tumefacción, dolor y deformidad. En algunos pacientes, el comienzo de la enfermedad se caracteriza por astenia y dolor musculoesquelético hasta que se hace evidente la sinovitis.

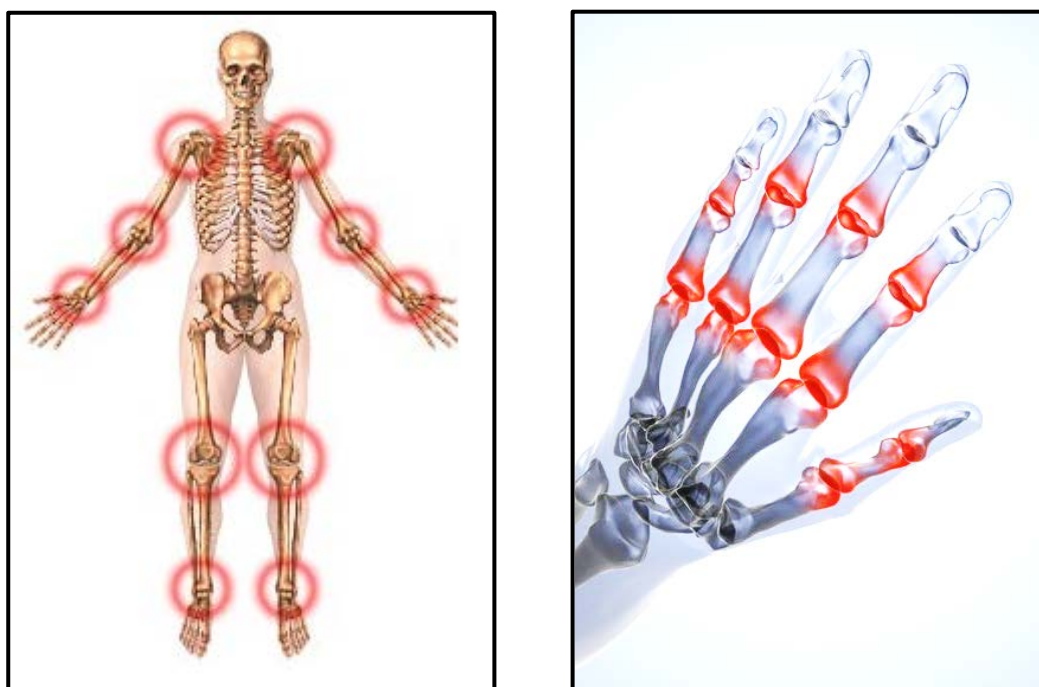


Figura 3. Afectación simétrica de articulaciones. La AR afecta generalmente a las articulaciones de forma simétrica. Afecta tanto a las articulaciones pequeñas (interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, metatarsofalángicas y muñecas) como a las grandes articulaciones (codos, hombros, rodillas, tobillos y caderas).

El dolor inflamatorio de las articulaciones se caracteriza por ser de tipo continuo, más intenso en reposo, de predominio nocturno y que va acompañado de rigidez matutina. Los daños estructurales generalmente son irreversibles, están causados por la sinovitis crónica y aparecen conforme avanza la enfermedad. Entre los daños estructurales irreversibles (Figura 4) encontramos pérdida de cartílago, presencia de erosiones óseas y deformidades de manos.

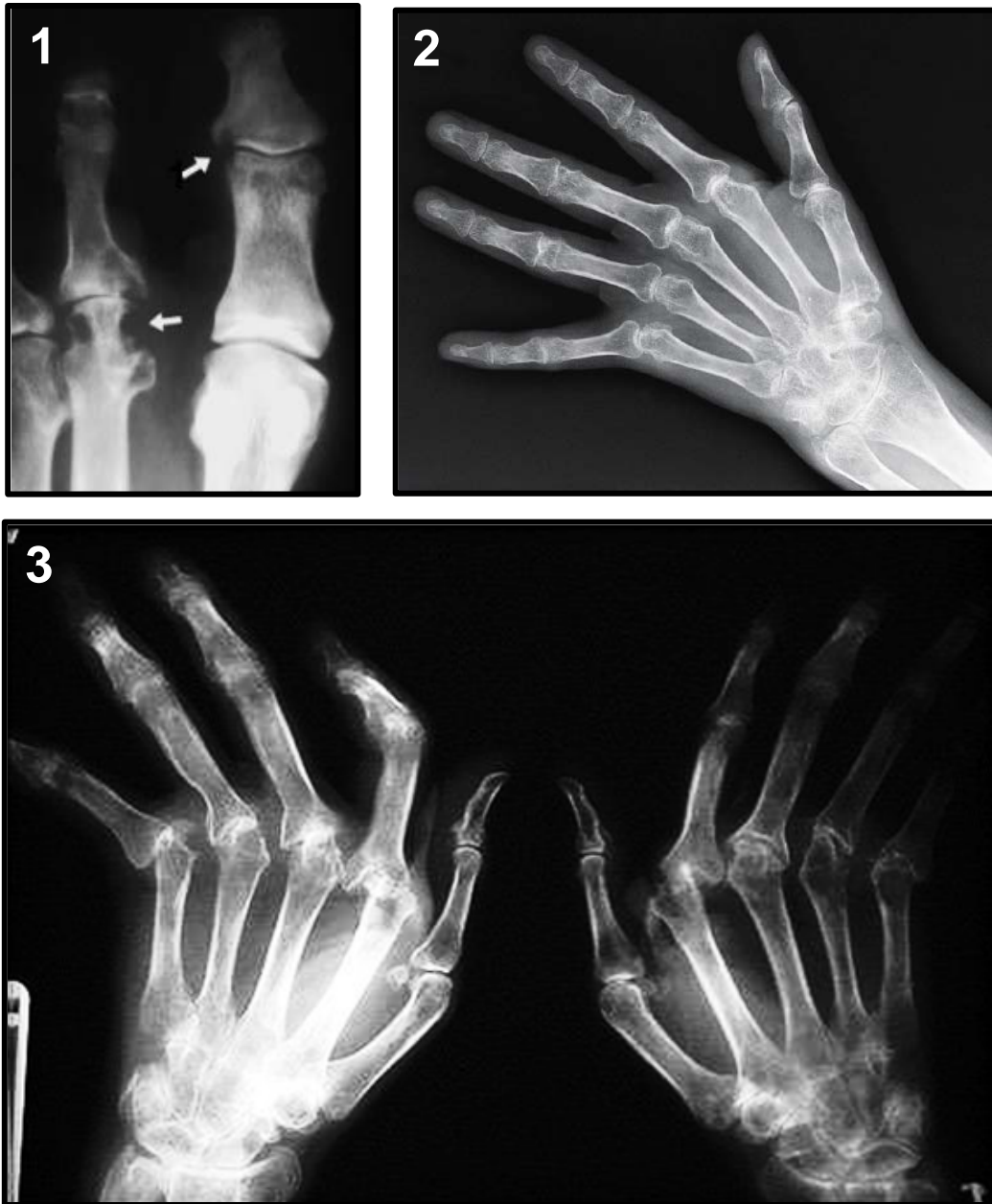


Figura 4. Radiografías anteroposterior de manos pacientes con AR. En la radiografía N°1 las flechas señalan las erosiones óseas típicas en la mano de una paciente. En la radiografía N°2 se observan alteraciones típicas de la AR: inflamación de tejidos blandos alrededor de las articulaciones metacarpofalángicas y muñeca, con estrechamiento difuso del espacio en las articulaciones interfalángicas proximales, metacarpofalángicas y radiocarpiana. Se observan erosiones articulares en la primera articulación carpometacarpiana. Osteopenia articular rodea todas las articulaciones. En la radiografía N°3 se observan disminución de los espacios articulares y erosiones óseas en las articulares metacarpofalángicas, interfalángicas y carpos de ambas mano. Las manos presentan deformidad en ráfaga característica de un estadio avanzado de la enfermedad. Fuente de las imágenes: Autor (2015).

Aunque la localización fundamental de las lesiones producidas en la AR es la membrana sinovial, a veces se pueden ver afectadas otras estructuras lo que convierte a la AR en una enfermedad sistémica y no órgano específica. Estas

alteraciones que afectan a órganos diferentes de las articulaciones se denominan manifestaciones extraarticulares (Figura 5):

- a) **Nódulos reumatoides:** son las manifestaciones extraarticulares más características de la AR. Generalmente se asocian a enfermedad severa y FR positivo. Suelen ser subcutáneos pero a veces aparecen en la sinovial y en otras zonas. Son de consistencia firme y redondeados, pueden ser móviles sobre los planos profundos o estar adheridos al periostio o los tendones.
- b) **Vasculitis:** es una complicación rara y cualquier vaso del organismo puede resultar afectado. El signo clínico más frecuente es la presencia de infartos digitales que en ocasiones evoluciona a gangrena. En las manifestaciones secundarias de las vasculitis encontramos úlceras crónicas en miembros inferiores, arteritis necrotizante de vasos mesentéricos, coronarios y renales.
- c) **Manifestaciones pulmonares:** las manifestaciones pulmonares son frecuentes. Dentro de estas manifestaciones encontramos la pleuritis (con o sin derrame), fibrosis intersticial progresiva, nódulos pulmonares. El líquido del derrame pleural se caracteriza por ser un exudado con cifras muy bajas de glucosa, factor reumatoide positivo y complemento bajo.
- d) **Manifestaciones cardiovasculares:** se pueden presentar derrame pericárdico con o sin pericarditis. Los nódulos reumatoides cardiacos se demuestran en estudios de autopsia y se observan en el miocardio y las válvulas y pueden causar alteraciones en la conducción aunque son una manifestación extraordinariamente rara.
- e) **Manifestaciones oculares:** más del 25% de los pacientes pueden presentar xeroftalmia y xerostomía pero sólo de un 10 a un 15% de ellos reúnen los criterios necesarios para el diagnóstico del Síndrome de Sjögren (SS) Secundario.
- f) **Manifestaciones hematológicas:** con frecuencia puede aparecer anemia normocítica hipocrómica debido a pérdidas crónicas por vía gastrointestinal, niveles bajos de hierro, absorción deficiente y eritropoyesis alterada. Otras alteraciones presentes pueden ser leucocitosis y trombocitosis.

- g) **Síndrome de Felty**: triada formada por AR, neutropenia ($<2.000/\text{mm}^3$) y esplenomegalia que se observa en enfermos con larga evolución y seropositividad. Su tratamiento requiere un control exhaustivo de la actividad inflamatoria de la AR.

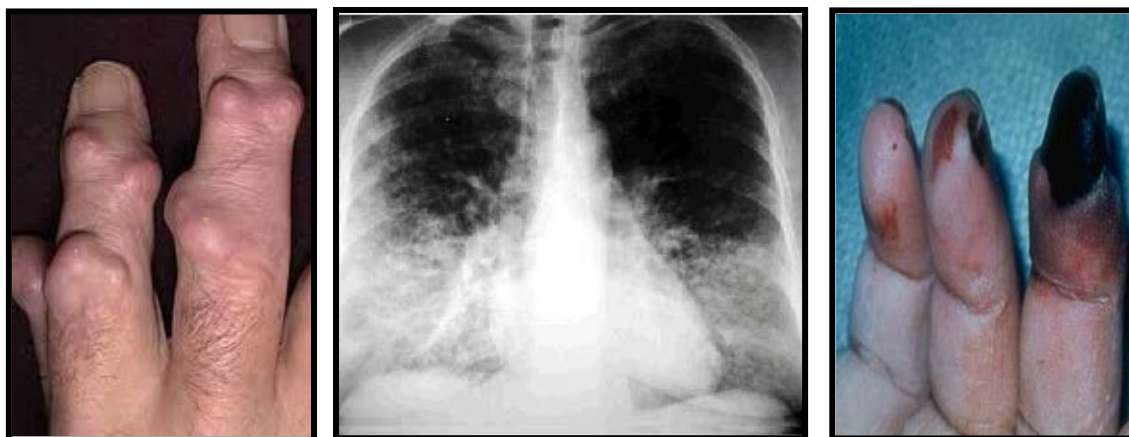


Figura 5. Manifestaciones extraarticulares de la AR. Las imágenes corresponden a nódulos reumatoides, enfermedad pulmonar intersticial y vasculitis.

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la historia clínica y los hallazgos de la exploración en la que se debe objetivar sinovitis presente al menos durante 6 semanas, apoyado por datos de laboratorio y radiológicos. Con propósito de clasificación de los pacientes se emplean los criterios de clasificación para la AR establecidos por el American College of Rheumatology (ACR)⁷ en el año 1987.

Estos criterios fueron establecidos con el objetivo de clasificar a los pacientes con AR, diferenciarlos de otras enfermedades y no como una herramienta diagnóstica. Por lo tanto, sirven para definir poblaciones homogéneas de pacientes para estudios clínicos, permiten comparar poblaciones y generalizar los resultados de la población estudiada a otras poblaciones (Tabla 1).

Por ello, son poco sensibles a la hora de diagnosticar pacientes en fase temprana de la enfermedad y no son útiles para el diagnóstico y manejo individual de un paciente⁸. El diagnóstico precoz de la enfermedad es fundamental para evitar la destrucción articular que provoca erosiones óseas.

Uno de los principales retos del reumatólogo es el diagnóstico precoz de la AR junto con un inicio del tratamiento rápido e intenso con FARMES. El daño articular provocado por la AR se inicia de manera temprana y se ha demostrado que los tratamientos aplicados de forma precoz son más efectivos que cuando se aplican de forma tardía^{9,10}. Esta instauración precoz del tratamiento aumenta la probabilidad de controlar la inflamación y el daño estructural. Así, se conoce como “ventana de oportunidad terapéutica” al tiempo transcurrido desde el inicio de la clínica hasta la aparición de alteraciones estructurales^{11,12}.

Criterio	Definición
Rigidez matutina	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora.
Artritis de 3 o más grupos articulares	Al menos 3 grupos articulares deben estar inflamados simultáneamente y ser objetivados por un médico.
Artritis de las articulaciones de la mano	Al menos una articulación de las manos debe estar inflamada (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales).
Artritis simétrica	Afectación simultánea del mismo grupo articular (definido en el criterio 2) en ambos lados del cuerpo.
Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxta-articulares observados por un médico.
Factor reumatoide positivo en suero	Presencia de valores elevados de factor reumatoide por cualquier método con un resultado en controles inferior al 5%.
Alteraciones radiológicas	Alteraciones radiológicas típicas de AR en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en articulaciones afectadas.

Tabla 1. Criterios de clasificación para la AR del American College of Rheumatology (1987)⁷. Los pacientes que cumplen $\geq 4/7$ criterios son clasificados como AR. Los criterios 1-4 han de estar presentes al menos durante 6 semanas. Los 14 grupos articulares a tener en cuenta en el criterio nº 2 son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.

La AR temprana o de inicio reciente se define cuando el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta que el paciente se diagnostica es inferior a 2 años. Recientemente, este tiempo se ha desplazado hacia los 12 primeros meses¹³.

La destrucción articular evidenciada por daño radiológico, discapacidad y pérdida de la masa ósea axial y periférica ya se produce en estos dos primeros años siendo en el primer año de evolución donde se evidencia una tasa de progresión radiológica más acelerada^{14,15}. Este diagnóstico temprano de la AR ayuda a identificar individuos que pueden desarrollar una enfermedad severa y destructiva para que pueda ser iniciado el tratamiento adecuado dentro de la ventana de oportunidad terapéutica y antes que se produzcan daños irreversibles en el paciente.

Los criterios de la ACR de 1987 tienen una sensibilidad entre el 79 y el 80% para la AR establecida con una especificidad entre el 90 y el 93%. Sin embargo, cuando estos criterios son aplicados a pacientes con AR de inicio reciente o temprana, la sensibilidad se sitúa entre el 77 y el 88% y se observa una disminución importante en su especificidad comprendida entre el 33 y 77% según la formulación empleada (en texto o en árbol de decisión)¹⁶.

En 2010 se publicaron los nuevos criterios de clasificación para la AR resultado del trabajo conjunto entre el ACR y la European League Against Rheumatism (EULAR). Estos criterios se crearon para mejorar los criterios de clasificación de la AR usados hasta ahora y con la finalidad de emplearlos tanto para el diagnóstico individual como para la clasificación de los pacientes y sobre todo en las formas tempranas de AR¹⁷.

En un estudio comparando los criterios de clasificación de la ACR de 1987 frente a los criterios de clasificación de la ACR/EULAR de 2010 se observó que estos últimos criterios clasificaban más pacientes con AR en fase temprana que los primeros con una capacidad discriminatoria aceptable¹⁸.

Estos nuevos criterios de diagnóstico y clasificación para la AR (Tabla 2) se deberán aplicar a una población diana que debe cumplir dos características:

- Presentar al menos una articulación con sinovitis clínica (al menos una articulación inflamada).
- Que dicha sinovitis no pueda explicarse por otra enfermedad.

Criterios de clasificación para AR de 2010 (ACR/EULAR)	Puntos
1. Afectación articular	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas (con/sin afectación articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas (con/sin afectación articulaciones grandes)	3
> 10 articulaciones (al menos una articulación pequeña)	5
2. Serología	
FR y Anti-CCP negativos	0
FR y/o Anti-CCP positivos bajos (<3 VN)	2
FR y/o Anti-CCP positivos altos (>3 VN)	3
3. Reactantes de fase aguda	
PCR y VSG normales	0
PCR y/o VSG elevadas	1
4. Duración de los síntomas	
Inferior a 6 semanas	0
Igual o superior a 6 semanas	1

Tabla 2. Criterios de clasificación para AR de 2010¹⁷. El paciente ha de tener una puntuación $\geq 6/10$ en el sistema de puntuación de la tabla para ser clasificado como AR. Aquellos pacientes que tienen una puntuación $< 6/10$ no se clasifican como AR aunque pueden ser reevaluados y los criterios pueden cumplirse en el tiempo. Las articulaciones grandes se refieren a los hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos. Las articulaciones pequeñas se refieren a metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, metatarsfalángicas, interfalángica del pulgar y carpos.

Uno de los cambios más significativos de estos criterios es la inclusión de la valoración de los marcadores serológicos de la AR y de los reactantes de fase aguda. Dentro de los marcadores serológicos, además del FR se valora por primera vez la presencia de los anticuerpos anti-peptido citrulinado cíclico (anti-CCP). Pero, no sólo considera la ausencia o presencia de los mismos (positivo o negativo) sino que introduce una ponderación según el título de los mismos. Por lo tanto, la ponderación de los pacientes con los dos marcadores negativos, aquellos pacientes que tienen uno o ambos marcadores positivos con títulos bajos, y aquellos pacientes que tienen marcadores positivos con títulos altos es diferente¹⁷. Algunas consideraciones importantes relativas a esos nuevos criterios se exponen a continuación:

- 1) Las **manifestaciones tardías de la enfermedad** (erosiones y nódulos articulares) dejan de formar parte de los criterios de clasificación al ser una expresión tardía ya que estos criterios están destinados al diagnóstico precoz de la enfermedad. Aquellos pacientes que presenten erosiones típicas de AR son clasificados como tales.
- 2) Los pacientes que presenten una **enfermedad de larga evolución (activa o inactiva)** pero que el estudio de los datos retrospectivos del mismo permita su clasificación con estos criterios, pueden ser clasificados como AR definitiva.
- 3) En escenarios de **artritis de muy reciente comienzo denominada así a la que tiene inicio de síntomas ≤ 3 meses**, los individuos pueden que no cumplan en un momento dado los criterios pero pueden ser reevaluados con el paso del tiempo y cumplir los criterios.

1.5 Marcadores de inflamación

La PCR y la VSG son los marcadores empleados más usualmente como reactantes de fase aguda para evaluar la actividad de la enfermedad y la progresión. Se elevan en condiciones inflamatorias, infecciones y en neoplasias. Estos reactantes de fase aguda no son específicos pero se correlacionan bien con la actividad de la enfermedad y el daño radiográfico en la AR¹⁹⁻²². Existen otros marcadores de actividad inflamatoria como las ILs, el TNF- α y las MMPs que se emplean generalmente en estudios de investigación.

En un estudio por Lindqvist y cols. realizado en una cohorte de pacientes con AR temprana y tras 10 años de seguimiento se encontró que a los 5 años de seguimiento, una VSG elevada era predictor de desarrollo de daño articular en manos y pies. Junto a la VSG; el FR IgA, COMP y los anti-CCP también predijeron el desarrollo de daño articular. Sin embargo, a los 10 años de seguimiento, sólo los anti-CCP y la PCR basales explicaron las variaciones en el índice radiológico de Larsen²³.

Los niveles de VSG se tienden a correlacionar con la actividad de la enfermedad así como con la severidad de la enfermedad y podrían ser útiles en la monitorización de la respuesta terapéutica^{24,25}. Sin embargo, el 25-50% de los pacientes con AR presentan valores normales de VSG y más de un cuarto de los pacientes con una enfermedad severa o muy severa tienen valores de VSG de 20 mm/h o inferiores, es decir, en el rango de normalidad^{26,27}. Además, la VSG se ve influenciada por factores como la edad, el género, los niveles de fibrinógeno, anemia y la hipergammaglobulinemia^{28,29}.

La PCR es más sensible que la VSG para identificar los cambios en la actividad de la enfermedad y se aconseja como medida de actividad. A diferencia de la VSG, la PCR puede ser medida en muestras de suero almacenado correctamente y es independiente de la concentración de hemoglobina. No obstante, los niveles de PCR también se elevan con la edad y el género influye en los niveles de PCR siendo mayor en mujeres que en hombres³⁰.

La elevación conjunta de PCR y VSG son fuertes indicadores de progresión radiológica frente al aumento aislado de PCR. En un estudio con 147 pacientes, la ausencia o la progresión del daño articular radiológico después de dos años de seguimiento fue correctamente prevista en 83 pacientes usando una combinación de marcadores de actividad de la enfermedad al comienzo (evaluado por la PCR, VSG o DAS) junto con la presencia de genes DR4 y FR positivo³¹.

VSG y PCR han demostrado que son igualmente útiles como componentes de fase aguda en los criterios de remisión de la ACR. El Disease Activity Score (DAS) y el Disease Activity Score de 28 articulaciones (DAS28) incluyen la VSG en su cálculo. La fórmula para calcular el DAS28 con la PCR (DAS28-PCR) subestima la actividad de la enfermedad y sobreestima la mejora de la actividad de la enfermedad comparada con el DAS28³².

1.6 Evolución clínica y pronóstico

La evolución clínica de los pacientes es una variable difícil de predecir debido a que la mayoría de ellos presentan actividad mantenida en el tiempo aunque de carácter fluctuante, acompañado de un grado variable de deformidad articular y deterioro funcional. La progresión más rápida tiene lugar durante los seis primeros años de la enfermedad y después la evolución es más lenta. Tras 10-12 años, más del 70% de los pacientes presentan signos de incapacidad o de deformidad articular.

En 1999 Kirwan³³ publicó una revisión de la literatura con la intención de estudiar la relación existente entre inflamación, lesión y discapacidad en esta enfermedad (Figura 6).

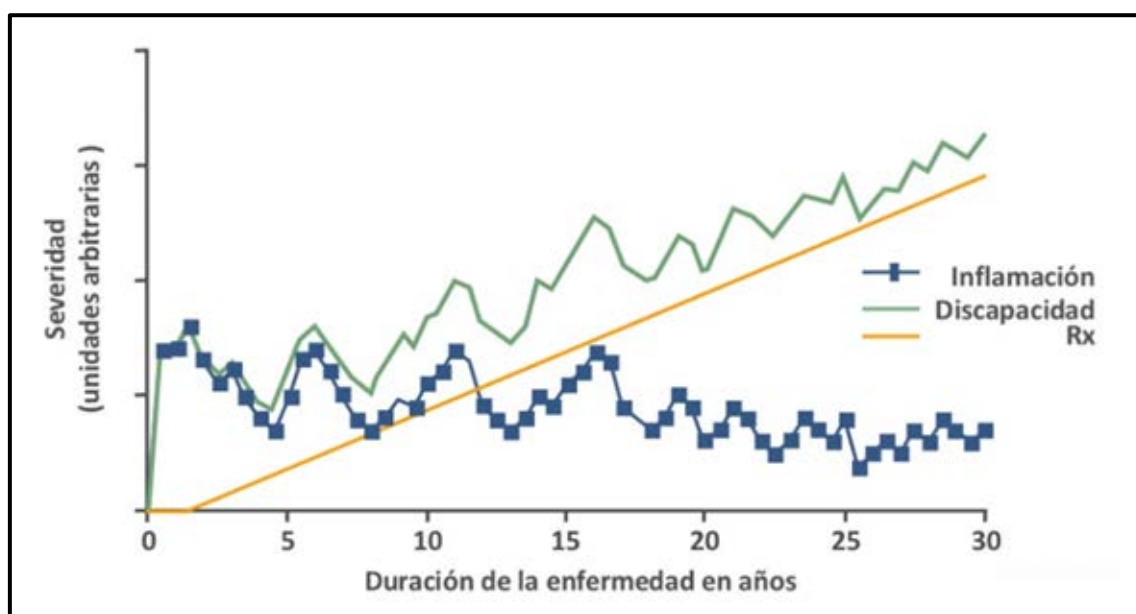


Figura 6. Curso de la AR³³. Aunque la inflamación articular puede ser moderada en el tiempo debido a la acción del tratamiento, la lesión radiológica (Rx) sigue progresando y paralela a ella la discapacidad del paciente. Esta concordancia entre discapacidad y lesión radiológica no se da en los primeros años en los que parece que la discapacidad es consecuencia de la inflamación articular.

Existen una serie de factores que se pueden encontrar presentes en el momento del diagnóstico y que suponen un peor pronóstico:

- FR positivo, sobre todo a títulos altos
- Sexo femenino
- Presencia de nódulos reumatoides

- Portador del EC HLA-DRB1 *0401/0404 positivo
- Recuento elevado de articulaciones dolorosas e inflamadas
- Presencia de erosiones radiológicas
- Bajo nivel de estudios
- Elevación de los reactantes de fase aguda (PCR y VSG)
- Anti-CCP positivos
- Presencia de manifestaciones extraarticulares
- HAQ elevado en la visita inicial

La presencia de uno o más de estos factores implica enfermedad con peor pronóstico. Aquellos pacientes que carecen de estos factores van a presentar cuadros más indolentes y que evolucionan más lentamente. El objetivo terapéutico consiste en conseguir la mínima actividad inflamatoria posible y mantenerla durante el máximo tiempo posible. Los tratamientos más precoces y más intensos mejoran el pronóstico de la AR entendida en términos de incapacidad funcional, daño estructural y/o mortalidad.

Como se expondrá en un apartado posterior, el EC HLA-DRB1 se asocia al desarrollo de una AR más erosiva y severa asociándose a la presencia de manifestaciones extraarticulares. Es probable que el EC no sea responsable directo de ese peor pronóstico sino que influye indirectamente vía producción de anticuerpos anti-CCP³⁴⁻³⁶. El uso combinado del FR y los anti-CCP presentan un mayor valor predictivo para una AR erosiva que cada uno de ellos por separado³⁷.

Por ejemplo, en un estudio por Kroot y cols. se concluyó que los enfermos con AR que tienen anti-CCP positivos desarrollan un daño radiológico más severo a los seis años que en aquellos donde son negativos estos anticuerpos. Otros factores que influyeron en el daño radiológico fueron la presencia de FR positivo y el índice radiológico inicial. Sin embargo, en la discapacidad funcional influyeron el sexo, la edad al inicio, la presencia de FR positivo y el índice de actividad DAS inicial³⁸.



Figura 7. Progresión radiográfica en la AR. Las imágenes muestran la evolución de las lesiones radiográficas y las deformidades en manos del seguimiento de una paciente con AR durante 21 años y mala respuesta al tratamiento. Debajo del tiempo en años se encuentra el valor del índice de Sharp para esa fecha. El índice de Sharp se emplea para cuantificar el daño de la progresión radiográfica causada por la enfermedad. Este índice emplea 27 articulaciones en cada mano y muñeca y le otorga a cada una de ellas una puntuación distinta para el estrechamiento del espacio articular y las erosiones articulares.

1.7 Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con AR ha mejorado mucho en los últimos años gracias al conocimiento acerca de la fisiopatología de la enfermedad. Este tratamiento se basa en tres pilares fundamentales:

- 1) Terapia no farmacológica que consiste en educación del paciente sobre la enfermedad, reposo y desarrollo de ejercicio y terapia funcional.

- 2) Tratamiento farmacológico: nuevos medicamentos y nuevas estrategias de tratamiento, como el tratar dentro de la ventana de oportunidad terapéutica y siguiendo pautas de control estricto de la actividad inflamatoria y persiguiendo objetivos terapéuticos determinados.
- 3) Cirugía indicada en aquellos casos donde encontramos destrucción ósea y articular grave que provoca alteración funcional.

La Sociedad Española de Reumatología (SER) ha establecido unas recomendaciones para el tratamiento farmacológico de los pacientes con AR. Estas recomendaciones se resumen a continuación³⁹.

En la AR de inicio reciente se recomienda que todos los pacientes sean tratados con **FARMES** tan pronto se establezca el diagnóstico clínico de la enfermedad independientemente del cumplimiento de los criterios de clasificación de la ACR para AR. El tratamiento inicial de todos los pacientes que no hayan sido tratados con ningún FARMES es el metrotexato (MTX) por su excelente perfil de eficacia y seguridad. Junto al MTX, la leflunomida (LFN) ha demostrado una mayor eficacia que el resto de FARMES.

En la AR de inicio sin marcadores de mal pronóstico (erosiones articulares, ANTI-CCP positivo, FR positivo, presencia de manifestaciones extraarticulares, HAQ superior a 1 o elevada carga inflamatoria) se podría valorar el tratamiento con otros FARMES con menor perfil de toxicidad y menor complejidad en la monitorización como la salazopirina o los antipalúdicos. Se recomienda valorar el fracaso terapéutico o la toxicidad de los FARMES en un plazo máximo de tres meses y, en consecuencia, considerar el cambio de tratamiento. El objetivo del tratamiento debe ser la remisión (DAS28<2,6) o mantener un estado de actividad mínima de la enfermedad (DAS28<3,2).

En la AR de inicio reciente se recomienda la utilización de **glucocorticoides** por vía oral a dosis bajas como terapia modificadora de la enfermedad pero siempre en combinación con un FARMES. Los **antiinflamatorios no esteroideos (AINES)** y los **inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 (COXIB)** mejoran los síntomas y signos de la AR pero no se consideran FARMES ya que no modifican la progresión radiológica.

En una AR inicial en la que se prevé un curso especialmente incapacitante por las características de la enfermedad, del paciente o de la actividad laboral de éste, puede estar indicada la terapia combinada de inicio con MTX y un agente anti-TNF, con el objetivo de inducir una rápida remisión e intentar retirar el agente anti-TNF y mantener la remisión de la AR con el MTX en monoterapia.

La **terapia biológica** (Figura 8) se valorará en aquellos pacientes donde el tratamiento con un FARMES relevante como MTX o LFN no haya conseguido el objetivo terapéutico. Los fármacos biológicos anti-TNF (infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab y etanercept), el tocilizumab y el abatacept tienen indicación a fallo de FARMES. El rituximab se empleará cuando falle otra terapia biológica previa.

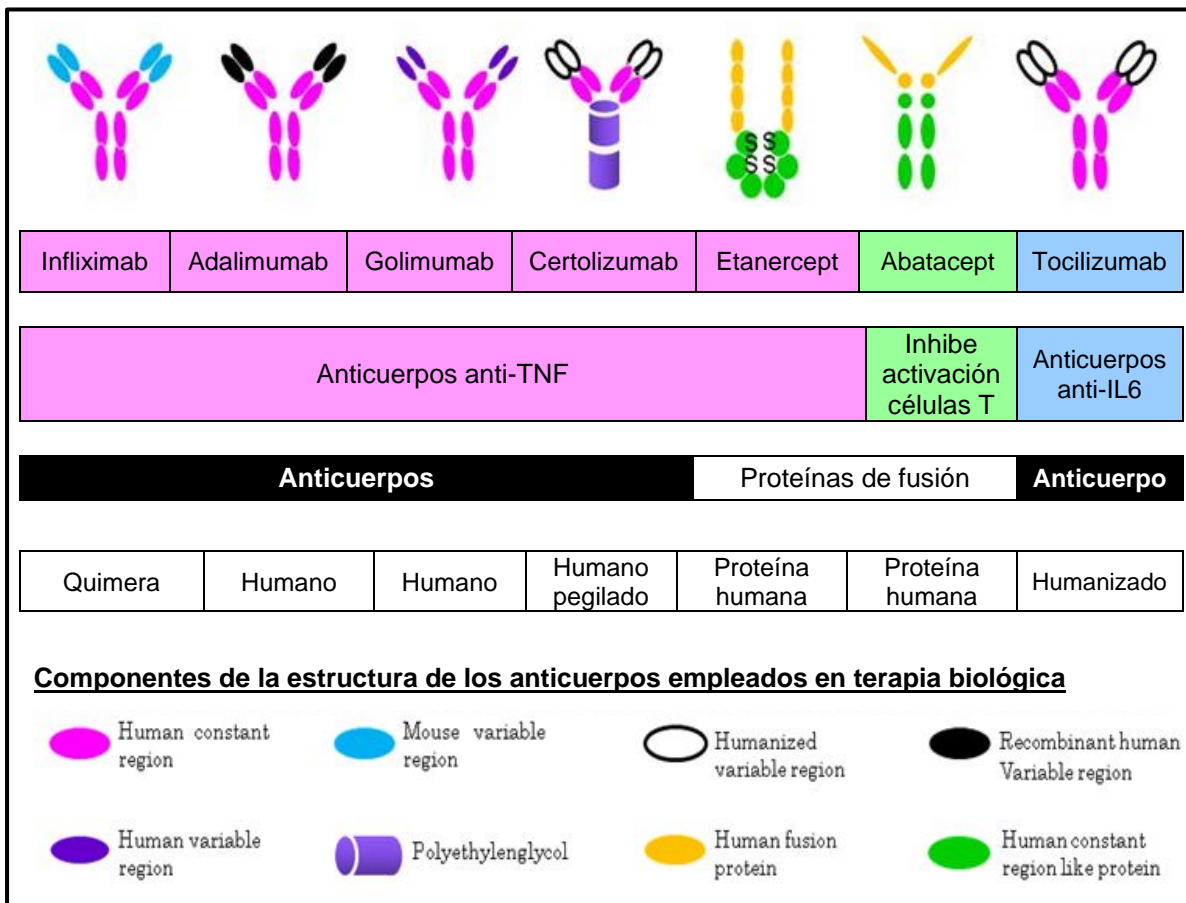


Figura 8. Tipos de agentes biológicos empleados en la terapia para la AR. Los agentes biológicos empleados en AR pueden estar dirigidos contra el TNF (infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab y etanercept), contra el receptor de la IL-6 (tocilizumab) o impiden que las células presentadoras de antígenos envíen una señal coestimuladora a las células T con el fin de activarlas (abatacept). Todos los agentes biológicos son anticuerpos excepto el etanercept y abatacept que son proteínas de fusión.

Aunque la etiología de la enfermedad no es bien conocida, la AR es una enfermedad de origen multifactorial y secundaria a uno o varios factores que intervienen en una población. Es evidente que factores genéticos y ambientales están implicados en el desarrollo de la enfermedad como se observa tanto en estudios de concordancia de datos en gemelos como en un gran número de estudios genéticos y epidemiológicos⁴⁰. Además, la interacción entre ambos factores puede ser determinante en el desarrollo de la enfermedad^{41,42}.

2.1 Factores genéticos

La AR es una enfermedad autoinmune que tiene un fuerte componente genético en su patogénesis como se demuestra en estudios realizados en gemelos y en familiares de primer grado. En dichos estudios se observó la presencia de una concordancia de la enfermedad de entre el 12.3 y 15.4% para gemelos monocigotos comparado con el 3.5% en gemelos dicigotos. Para familiares de primer grado la concordancia fue de entre el 2 y 4% mientras que en la población general fue de entre el 0,5 y 1%. La prevalencia de la AR puede aumentar hasta un 12% en familiares directos de los pacientes^{40,43,44}.

Con estos estudios se estimó que el componente genético presenta un impacto considerable en la susceptibilidad a la enfermedad y supone entre un 50 y un 60% de los factores desencadenantes de la misma^{45,46}. Diversas combinaciones de alelos susceptibles localizados en varios genes están implicados en el desarrollo de la AR. Aunque el gen HLA-DRB1 es el principal y mejor conocido factor genético asociado a la AR; representa sólo una parte del riesgo en dicha patología. Estudios de asociación apoyan el papel de otros genes no HLA, incluyendo entre ellos a PADI4, SLC22A4, RUNX1, y PTPN22.

2.1.1 Función de los genes HLA

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno y están formadas por dos cadenas polipeptídicas denominada α y β unidas de forma no covalente (Figura 9).

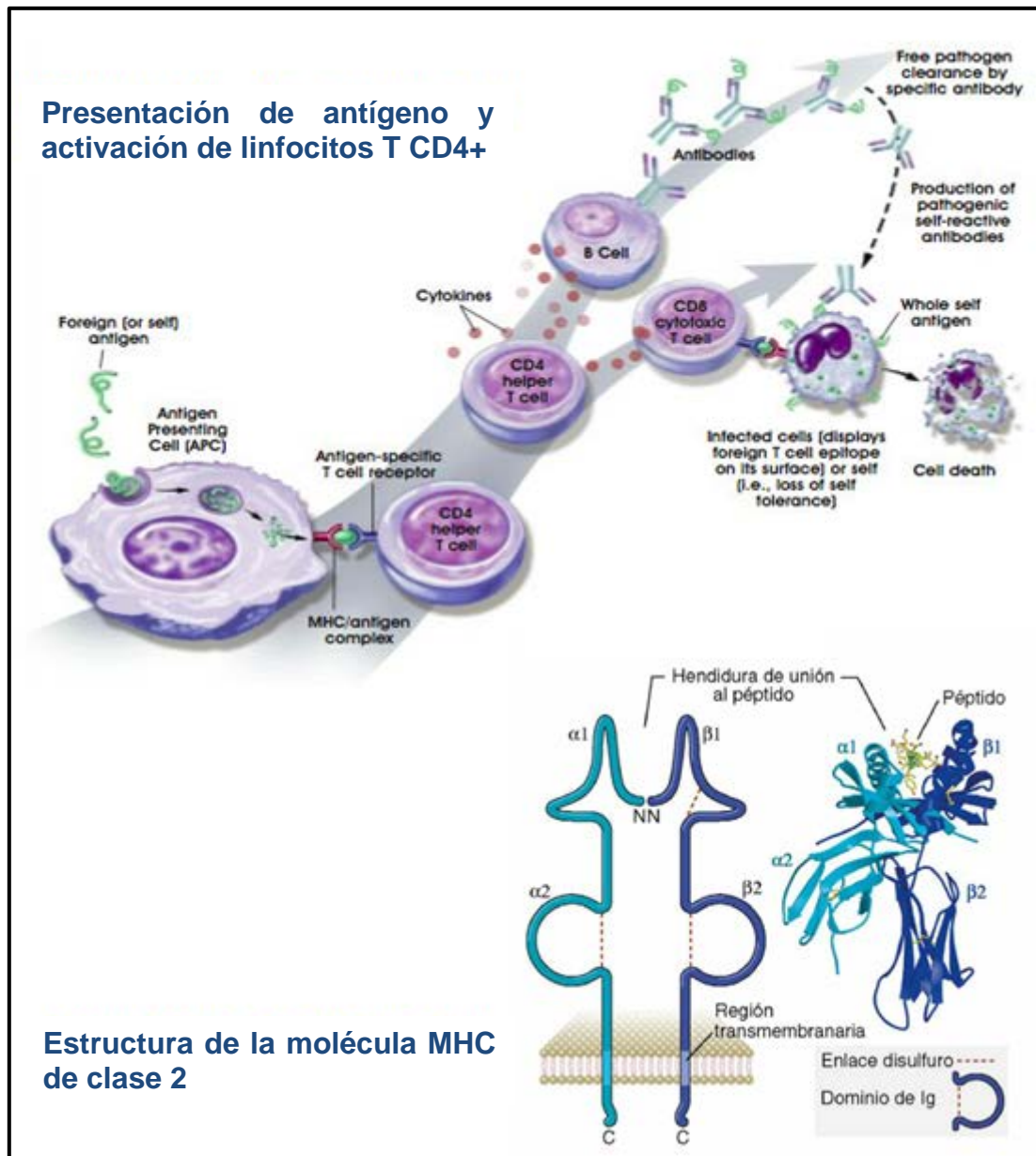


Figura 9. Presentación de un antígeno y activación de células T CD4+. La imagen corresponde a la activación de los linfocitos T ante la presencia de un antígeno extraño. Las moléculas del MHC de clase II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno y están formadas por dos cadenas polipeptídicas denominadas alfa y beta unidas de forma no covalente. Intervienen en la activación y diferenciación de los linfocitos T mediante la presentación de antígenos a través de la interacción MHC-TCR y ayuda a las células B en la producción de anticuerpos.

Estas moléculas son las encargadas de presentar los péptidos a las células T CD4⁺ interviniendo en el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio y la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa contra patógenos. Las cadenas α y β de las moléculas del MHC de clase II son codificadas por los genes HLA de clase II: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ que se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 humano⁴⁷. Esta región tiene una elevada densidad génica con aproximadamente 220 genes, muchos de ellos con funciones inmuno reguladoras (Figura 10).

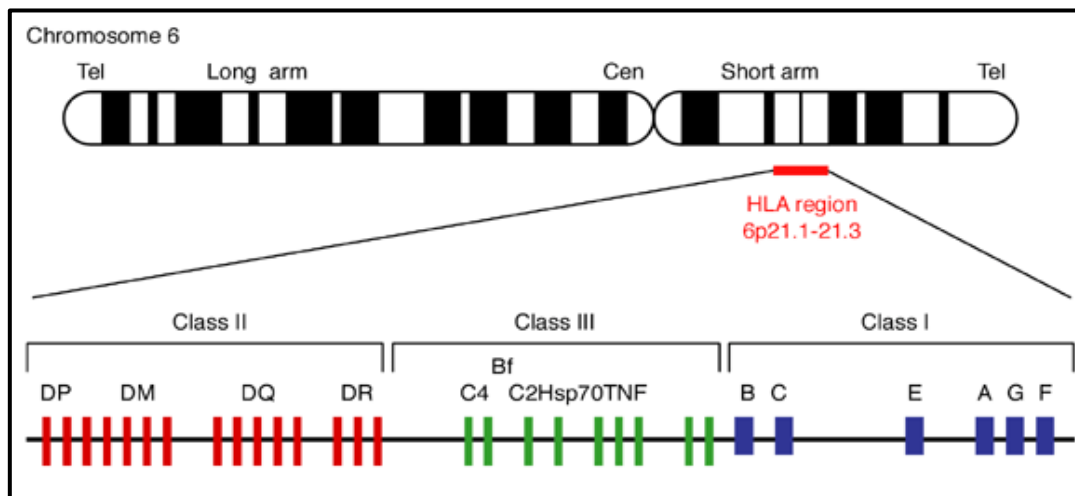


Figura 10. Mapa genético de la región HLA. La región HLA abarca $4 \cdot 10^6$ nucleótidos en el cromosoma 6p21.1 a p21.3 con los genes de clase II, III y I localizados desde el centrómero (Cen) hasta el telómero (Tel). Las moléculas HLA de clase I restringen la función de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos y median la respuesta inmune contra antígenos endógenos y objetivos infectados por virus. Las moléculas de clase II están implicadas en la presentación de antígenos exógenos a las células T ayudadoras o colaboradoras. Por último, las moléculas de clase III contiene genes que codifican proteínas que no tienen relación con la inmunidad mediada por células que, sin embargo modulan o regulan la respuesta inmune a través de varios intermedios como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o las proteínas del complemento (C2, C4)⁴⁷.

Las cadenas α y β están codificadas por las regiones HLA-DRA y HLA-DRB1 respectivamente y presentan regiones constantes y variables. Existen dos variedades de HLA-DRA ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y una amplia gama de HLA-DRB1.

2.1.2 Hipótesis del Epítipo Compartido

El factor genético más importante para el desarrollo de la AR se asocia con la región génica HLA y contribuye entre un 30 y un 50% de la susceptibilidad genética

total hacia el desarrollo de la enfermedad^{48,49}. Las primeras evidencias de la asociación entre la región HLA y la AR se remontan a la década de los años setenta donde se observó una mayor frecuencia de individuos con el serotipo HLA-Dw4 en pacientes con AR comparado con controles sanos. En 1978 Stastny señaló que el 70% de los pacientes caucásicos con AR eran HLA-Dw4 positivos comparados con el 28% de controles sanos. Este serotipo HLA-Dw4 estaba ligado a un conjunto de alelos del gen HLA-DRB1⁵⁰⁻⁵². Desde entonces los genes HLA han sido los más estudiados y mejor caracterizados en relación a la predisposición al desarrollo de la enfermedad. Tras esta descripción inicial del serotipo HLA-Dw4 (subtipo de HLA-DR4) se demostró que no es uno, sino varios de los alelos HLA-DRB1*04 (DRB1*0401, *0404, *0405 y *0408) los que estaban asociados con la AR. La familia de alelos DR4 contiene al menos 22 miembros pero sólo algunos están relacionados con la AR. Posteriormente se describió la asociación de la enfermedad con otros alelos HLA-DRB como *0101, *0102 y *1001⁵³⁻⁵⁵.

Los dos alelos DRB1*0401 y DRB1*0404 dan cuenta de la asociación inicial observada entre el serotipo DR4 y la enfermedad en caucásicos. Por otro lado, la asociación serológica con DR1 se ha observado en pacientes caucásicos que son negativos para DR4⁵⁶. Este conjunto de alelos fuertemente asociados con la patogenia de la enfermedad codifican una secuencia conservada de cinco aminoácidos Q/R⁷⁰K/R⁷¹R⁷²A⁷³A⁷⁴ [Glutamina/Arginina-Lisina/Arginina-Arginina-Alanina-Alanina] entre las posiciones 70-74 de la tercera región hipervariable (HVR3) en la cadena beta de la molécula HLA DRB1 que se conocen como "EC" y condiciona la susceptibilidad a la AR: ⁷⁰QKRAA⁷⁴, ⁷⁰QRRRAA⁷⁴ y ⁷⁰RRRAA⁷⁴. Esta secuencia esta codificada por los alelos HLA-DR4 (DRB1*0401, *0404, *0405 y *0408), HLA-DR1 (DRB1*0101 y *0102) y HLA-DR10 (DRB1*1001).

Estos residuos constituyen uno de los dominios en α -hélice de una región que es fundamental en el proceso de reconocimiento antigénico y que determina un bolsillo de unión a péptidos (Figura 11). Los aminoácidos arginina o lisina en la posición 71 tienen carga positiva haciendo que este hueco tenga alta afinidad por residuos con cargas negativa o polares sin carga.

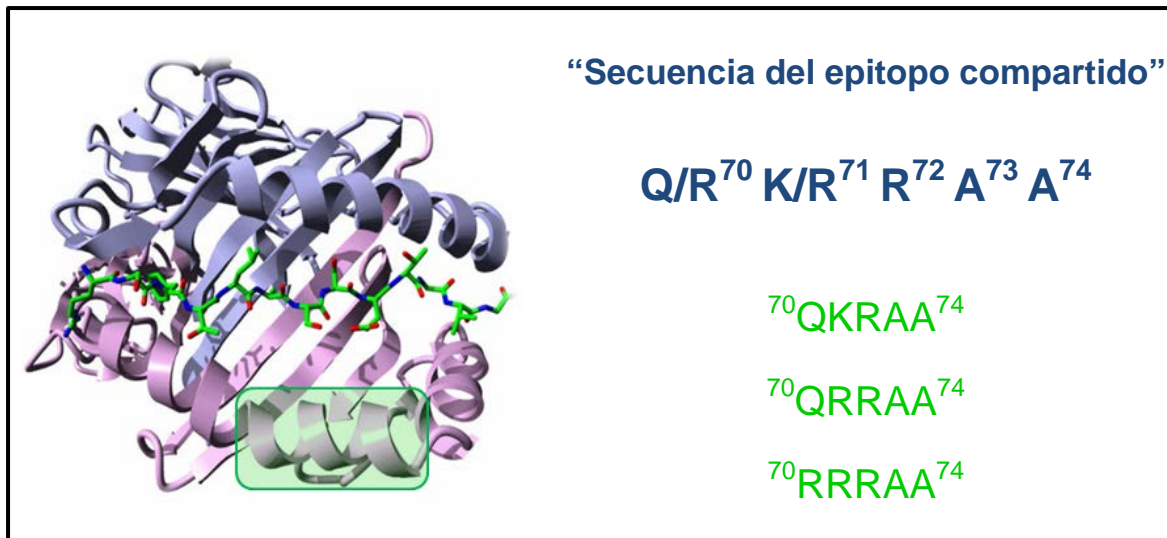


Figura 11. Localización del “EC” en la molécula HLA de clase II y secuencias de aminoácidos que codifican para el EC. El recuadro marca la posición de la tercera región hipervariable entre los aminoácidos 70-74 de la molécula HLA de clase II. En esta región el EC o la secuencia DERRAA puede estar presente. Estos residuos o aminoácidos son esenciales para la formación de un hueco o bolsillo de unión a péptidos denominado bolsillo p4. Adaptado de Boot y cols⁵⁷.

En base a estas observaciones, en 1987 Gregersen y colaboradores fueron los primeros en unificar los alelos HLA-DRB1 asociados a AR y plantearon la **“Hipótesis del EC”** según la cual las moléculas del EC HLA-DRB1 se unen a ciertos péptidos generando una respuesta inmune que predisponen a padecer AR⁵⁸⁻⁶⁰.

Según esta hipótesis, el EC está directamente implicado en la patogénesis de la AR mediante la presentación de péptidos a células T artritogénicas. La presencia de estos alelos no solo incrementa el riesgo de padecer AR sino que su presencia se asocia a un peor pronóstico reflejado en pacientes con un mayor grado de destrucción articular y presencia de manifestaciones extraarticulares⁶¹⁻⁶³.

La hipótesis ha sido reforzada por el notable hecho de que entre algunas poblaciones étnicas donde el genotipo DR4 es raro; los alelos asociados con la AR contienen el EC. Un ejemplo lo encontramos la población nativa americana de los indios Yakima que presentan una alta prevalencia de AR y donde la enfermedad se caracteriza por ser severa con un comienzo precoz, alta frecuencia de erosiones radiológicas, nódulos reumatoides y FR positivo⁶⁴. Sin embargo, en esta población los alelos DR4 son raros y la AR está asociada con el alelo DRB1*1402⁶⁵. La secuenciación de este alelo reveló que los aminoácidos en las posiciones 70-74 corresponden a la secuencia ⁷⁰QRRAA⁷⁴ del EC. De este modo, el alelo DRB1*1402 (QRRAA) se incorporó a los alelos del EC asociados con la AR (Tabla 3).

Secuencia de Aminoácidos	Especificidad DR	Alelos HLA-DRB1	Subvariedad alelos HLA-DRB1	Especificidad Dw
Q R R A A	DR1	0101	DRB1*0101	Dw1
Q R R A A	DR1	0102	DRB1*0102	Dw20
Q K R A A	DR4	0401	DRB1*0401	Dw4
Q R R A A	DR4	0404	DRB1*0404	Dw14.1
Q R R A A	DR4	0405	DRB1*0405	Dw15
Q R R A A	DR4	0408	DRB1*0408	Dw14.2
R R R A A	DR10	1001	DRB1*1001	-
Q R R A A	DR14	1402	DRB1*1402	Dw16

Tabla 3. Clasificación de los alelos HLA-DRB1 implicados en la susceptibilidad a la AR^{66,67}. Secuencia de los aminoácidos de las posiciones 70-74 de la cadena DRB1 pertenecientes a los distintos alelos de las especificidades HLA implicadas en la susceptibilidad a la AR. Estas variedades de alelos se conocen como el EC. Las variedades serológicas relacionadas con los productos de los genes HLA-DRB1*01 y HLA-DRB1*04 se denominan HLA-DR1 y HLA-DR4 respectivamente. A su vez, las variedades HLADRB1*01 o HLA-DRB1*04 presentan subvariedades que se expresan con otro par de dígitos situados después del nombre principal: HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0102, etc.

La asociación de los alelos HLA-DRB1 con la AR es la única sólidamente replicada en todos los grupos étnicos estudiados⁴⁷:

- En los americanos y europeos del norte los alelos con mayor prevalencia son los HLA DRB1*04 (*0401, *0404) y HLA-DRB1*0101⁶⁸⁻⁷⁰.
- En los japoneses el alelo DR4 más prevalente es DRB1*0405 que está asociado al EC⁷¹. En los pacientes chinos con AR los alelos más frecuentes son DRB1*0405 y DRB1*0404⁷².
- En los italianos, judíos israelíes y españoles el alelo DR4 es raro siendo más frecuente los alelos DR1 y DR10. Dentro de estos alelos, el más característico en la población española es HLA-DRB1*0101^{56,73-75}. En la población húngara, los subtipos DRB1*0405 y DRB1*0408 del alelo DR4 están involucrados en la susceptibilidad a la AR⁷⁶.

- En las poblaciones nativas americanas de los indios Yakima, Tlingit y Pima, el alelo DRB1*1402 confiere susceptibilidad para el desarrollo de AR^{65,77}. En los indios Chippewa también está presente el alelo DR4⁷⁸.

2.1.3 Relevancia clínica del Epítipo Compartido

El EC se asocia a un riesgo aumentado en 2.5 veces de desarrollar AR. Pero el EC no es sólo un marcador de mayor riesgo para la AR sino que también es una herramienta con valor pronóstico en el curso clínico y severidad de la enfermedad como se demuestra en varios estudios⁷⁹⁻⁸².

La existencia de una correlación entre los alelos DR4 y la presencia de una enfermedad más severa y erosiva caracterizada por la severidad de los cambios radiográficos se ha descrito en muchos estudios^{80,83-85}. Esta asociación entre los alelos DR4 y una enfermedad erosiva también se ha confirmado en pacientes no caucásicos como japoneses y coreanos^{86,87}. En coreanos, por ejemplo, el alelo DRB1*0405 se asoció a la presencia de una enfermedad con erosiones óseas, deformación de articulaciones y manifestaciones extraarticulares. Sin embargo, no todos los estudios han encontrado correlación entre el EC y la severidad de la enfermedad⁸⁸⁻⁹⁰.

La fuerza de la asociación entre los alelos del EC y la susceptibilidad a la AR difiere entre los alelos DRB1. El alelo DRB1*0401 confiere un alto riesgo con un RR de 3 mientras que los alelos DRB1*0101, *0404 y *1001 exhiben un riesgo moderado con un RR de 1,5⁹¹. Las combinaciones específicas entre los alelos positivos del EC son importantes en la susceptibilidad a la enfermedad. La presencia de los alelos DR4 confiere un mayor riesgo de desarrollar AR que los alelos no-DR4 asociados al EC, como los alelos DR1. En la población caucásica se ha encontrado una jerarquía de riesgo según las combinaciones particulares de los alelos DR. El RR para las combinaciones heterocigotas DR1/X y DR4/X (donde X es un alelo distinto a DR4 y DR1) son de 3 y 5, respectivamente; mientras que para las combinaciones homocigotas son de 5 para DR1/DR1, 15 para DR4/DR1 y 25 para DR4/DR4⁹² (Tabla 4).

Combinaciones alélicas	Casos AR n (%)	Controles n (%)	RR	Significación
DR4/DR4	50 (22)	11 (3,7)	25	< 0,00001
DR4/DR1	47 (20)	15 (5,1)	15	< 0,00001
DR4/DRX	70 (30)	70 (23,6)	5	< 0,00001
DR1/DR1	5 (2)	5 (1,6)	5	< 0,01
DR1/DRX	29 (13)	50 (16,8)	3	< 0,0001
DRX/DRX	29 (13)	146 (49,1)	1	-

Tabla 4. Riesgo específico para los alelos del EC HLA-DRB1 para AR severa relativo a DRX/DRX calculado usando la frecuencia observada en controles⁹².

Los pacientes homocigotos para el EC DR4 u otros dos alelos positivos no muestran buenos resultados tras la medicación con metotrexato en comparación con aquellos pacientes que tienen un EC heterocigoto o negativo. Los pacientes homocigotos para DR4 muestran mejores resultados con una terapia con etanercept o una medicación combinada^{93,94}.

2.1.4 Implicaciones mecanicistas del Epítipo Compartido

En la actualidad, el mecanismo subyacente en la acción del EC no está totalmente claro. En base al rol que presentan las moléculas del MHC clase II en la unión a antígenos específicos y presentación de los mismos a las células T CD4+ podemos decir que en su acción estarían involucradas la presentación de auto-péptidos artritogénicos⁹⁵, el mimetismo molecular con antígenos extraños⁹⁶ y la selección de células T⁹⁷. En un intento de explicar como el EC funciona en su contribución a la AR se han desarrollado diferentes modelos:

- Un modelo sugiere que ciertos péptidos patogénicos pueden ser presentados a las células T sólo por los alelos positivos del EC.
- Otro modelo sugiere que estos péptidos alteran las células T específicas que son positivamente seleccionadas en el timo y conduciría a un repertorio diferente de células T que podrían incluir células T patogénicas autorreactivas.

- Un tercer modelo propone que la molécula HLA es procesada y entonces el EC sería el antígeno relevante unido por otra molécula HLA.
- Una última teoría sugiere el reconocimiento directo de las células T por el EC en vez de péptidos específicos.

En varios de estos modelos, el concepto de mimetismo molecular juega un papel importante. En este escenario, la homología existente entre residuos específicos polimórficos de la molécula HLA y aminoácidos de proteínas potencialmente antigénicas derivadas de agentes infecciosos podría conducir a un reconocimiento anormal de un auto-péptido. Un ejemplo de ello es la secuencia idéntica encontrada entre el EC y una porción de la glicoproteína gp110 del virus de Epstein-Barr⁹⁸.

Aunque todas estas hipótesis son plausibles; son difíciles de conciliar debido a que los datos que apoyan la respuesta específica a antígenos como evento primario en la AR son pocos concluyentes en la actualidad como se comentará más adelante.

2.1.5 Hipótesis del EC protector o modelo RAP

En el año 1998, Zanelli y cols. sugirieron otro modelo donde los locus DQB1 y DQA1 determinarían la susceptibilidad a la AR mientras que determinados alelos DRB1 actuarían como protectores y modularían este efecto. En este **modelo de protección de la AR (RAP o RA-protection)** los alelos que predisponen a la enfermedad son DQB1*0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0401 y *0402 combinados con DQA1*0301 o *0302 y DQB1*0501 combinado con DQA1*0101 o *0104. Los alelos protectores DRB1 (*0103, *0402, *1102, *1103, *1301 y *1302) se denominan ⁷⁰DERAA⁷⁴ por presentar esa secuencia de aminoácidos común en la región hipervariable 70-74⁹⁹⁻¹⁰¹ (Figura 12).

Esta secuencia ⁷⁰DERAA⁷⁴ corresponde a los aminoácidos Aspártico-Glutámico-Arginina-Alanina-Alanina y se encuentra presente en el 29% de la población general. La presencia de la secuencia DERAA confiere un menor riesgo de desarrollar AR tanto en presencia o ausencia del EC. De este modo, los pacientes DERAA positivos con una copia del EC comparados con los pacientes DERAA negativos con una copia del EC presentan una progresión radiográfica menos severa^{99,102}.

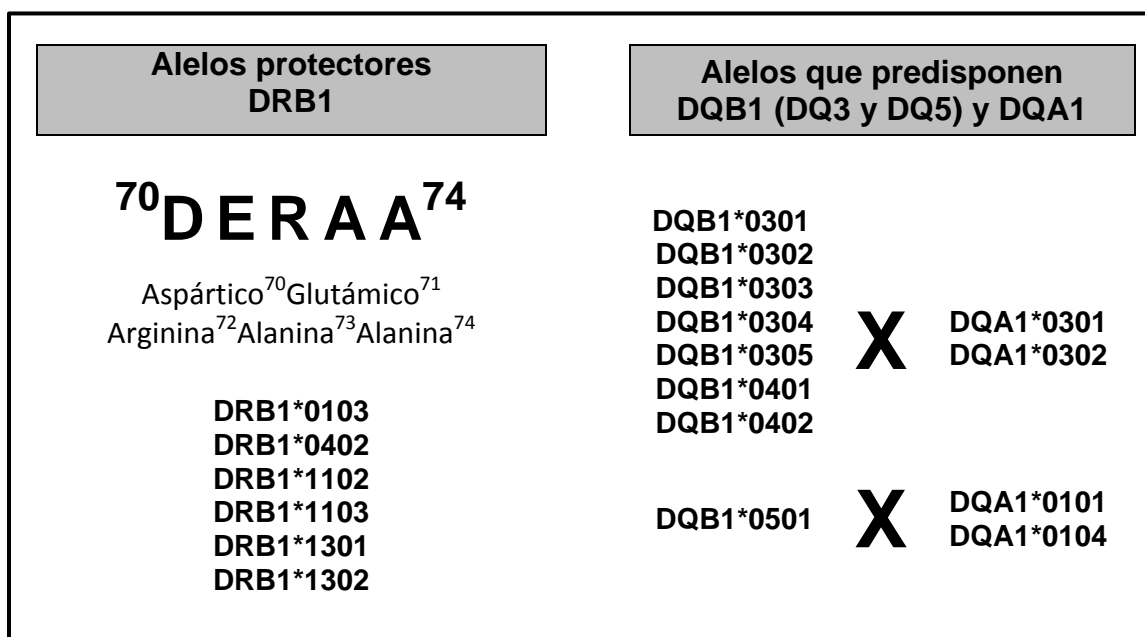


Figura 12. Hipótesis del EC protector⁹⁹⁻¹⁰¹. Los alelos correspondientes al EC protector presentan la secuencia DERA A entre las posiciones 70-74 y que protegen al sujeto de desarrollar AR. Las combinaciones alélicas entre los alelos DQB1 y DQA1 predisponen al desarrollo de AR.

Así, esta nueva hipótesis reconoce un nuevo EC DRB1 denominado DERA A que es reconocido por péptidos mientras que las moléculas DQ en vez de las moléculas DR son las que predisponen en la enfermedad. De este modo, junto a los alelos HLA-DRB1 que contribuyen al desarrollo de la AR, nos encontramos otra serie de alelos HLA-DRB1 que confieren protección contra ella.

Pascual y colaboradores encontraron en la población del sur de España que los alelos DQ5 (DQB1*0501/DQA1*0101) y DQ3 (DQB1*03 y *04 combinados con DQA1*03) predisponen los sujetos a padecer AR independientemente de los alelos del EC DRB1. Los sujetos homocigotos DQ3/3 tenían el mayor riesgo de desarrollar AR y las moléculas DQ3 influían más que las DQ5 en la predisposición a la enfermedad¹⁰¹.

En un estudio de cohortes se demostró que la presencia de la secuencia DERA A es un fuerte predictor independiente de un mejor pronóstico pero sólo en aquellos pacientes que no presentaban enfermedad erosiva en el momento de inclusión en el estudio¹⁰³. Los alelos que codifican la secuencia DERA A se consideran que ejercen un efecto protector frente a una AR con anti-CCP positivo asociándose a bajos niveles de dichos anticuerpos¹⁰⁴.

2.1.6 Otros genes asociados a la Artritis Reumatoide

Aunque el papel del EC HLA-DRB1 es relevante en la predisposición genética a la AR, sólo supone no más de 1/3 de la contribución genética total. Esto implica que existen otros genes que influyen en la enfermedad pero que no se encuentran en la región HLA. A la hora de estudiar estos genes que confieren susceptibilidad a la AR se han empleado dos aproximaciones: estudios de asociación y estudios de ligamiento. Con estos estudios se han encontrado otros polimorfismos genéticos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

2.1.7 Estudios de ligamiento

El objetivo de los estudios de ligamiento de genoma completo consiste en identificar regiones cromosómicas que predisponen hacia la enfermedad mediante el análisis de cosegregación de loci (transmisión conjunta de dos o más genes ligados en un mismo cromosoma) y enfermedad en familiares afectados por una determinada enfermedad. Para ello se estudian marcadores repartidos por todo el genoma y si un marcador está en ligamiento con un locus de susceptibilidad, los miembros afectados de la familia tendrán el mismo alelo del marcador.

Se han identificado numerosas regiones de ligamiento en AR. El primer estudio de rastreo genómico realizado en familias caucásicas de pacientes con AR reveló la existencia de 14 regiones candidatas. Se han realizado varios estudios de ligamiento en poblaciones de Europa, Reino Unido, Japón y EEUU y los resultados obtenidos confirman la importancia del locus HLA y aportan datos que apuntan a la existencia de aproximadamente 50 loci de susceptibilidad no-HLA¹⁰⁵⁻¹¹². Pero sólo unos pocos de estos loci han mostrado ligamiento en más de un estudio y son por tanto, los más prometedores a la hora de localizar genes candidatos asociados a la AR.

Tras identificar las posibles regiones cromosómicas de ligamiento y con objeto de identificar los genes candidatos en los loci de ligamiento se realizan estudios de mapeado fino y de asociación para buscar dichos genes de susceptibilidad a la AR. Una región de interés en AR corresponde al locus 1p36^{105,106} que contiene los genes TNFR2 y PADI4. Los resultados obtenidos no son del todo sólidos por falta de confirmación de los mismos. Estos resultados indican una evidencia relativamente débil de ligamiento debido a que estos genes no-HLA presentan un efecto moderado o

bajo en la predisposición a la enfermedad además de observarse discrepancias entre los distintos estudios realizados¹¹³. Estas discrepancias se deben a que los estudios incluyen unos pocos cientos de familias y el poder estadístico alcanzado no es suficiente para detectar los locus de susceptibilidad a AR ya que los locus contribuyen individualmente con un efecto modesto.

2.1.8 Estudios de asociación de genes candidatos y genoma completo

El objetivo de los estudios de asociación están enfocados en detectar si existe asociación entre uno o varios polimorfismos genéticos y la enfermedad. Se basan en estudios caso-controles donde se analizan las diferencias en la distribución de los alelos entre individuos afectados por la enfermedad y un grupo control de individuos sanos.

Los estudios de asociación pueden ser en base a pequeñas regiones cromosómicas que contienen genes candidatos o de genoma completo (GWAS). En el año 2007 fue llevado a cabo el primer estudio de GWAS asociado a la AR por el Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) en Reino Unido. En dicho estudio se demostró una asociación entre la AR con las regiones de susceptibilidad HLA-DRB1 en posición 6p21 y PTPN22 en posición 1p13^{114,115} (Figura 13).

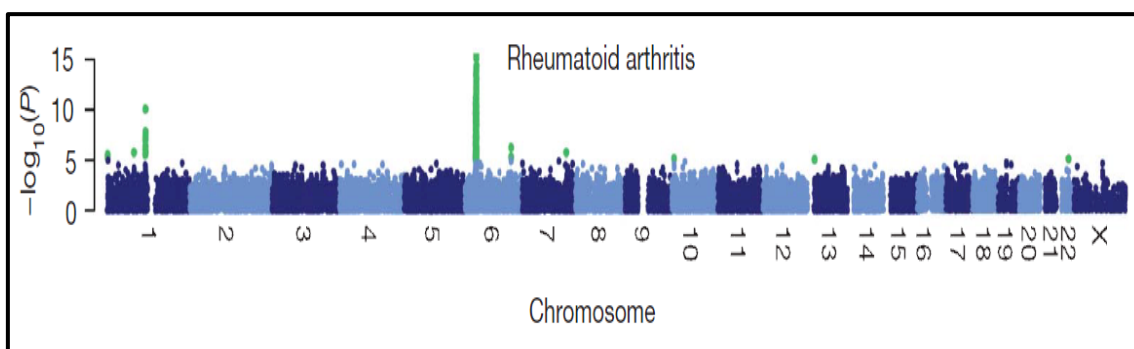


Figura 13. Estudio de asociación de genoma completo en AR¹¹⁴. En este estudio realizado en Reino Unido por el WTCCC se estudiaron 2000 casos y 3000 controles. Los cromosomas se señalan con alternación de colores azul y celeste. Las señales de asociación con valores de significación que oscilan entre 10^{-5} y $5 \cdot 10^{-7}$ se encuentran marcadas de color verde. Las señales de asociación más fuertes se localizaron en las regiones de HLA-DRB1 en el cromosoma 6 y PTPN22 en el cromosoma 1. Además, se observó también asociación de otros 9 SNPs con la AR (valores de p entre 10^{-5} y $5 \cdot 10^{-7}$).

Tras este primer estudio se realizó otro estudio donde se incluyeron pacientes AR con anti-CCP positivos y controles de Suecia y Norteamérica¹¹⁵. Al igual que en el caso anterior, las señales de asociación más fuertes con la enfermedad se localizaron en las posiciones 6p21 (HLA-DRB1) y 1p13 (PTPN22). Además, Plenge y colaboradores encontraron niveles de significación elevados en la región 9p33-34 del cromosoma 9 correspondiente al locus TRAF1-C5 y que incluye a los genes TRAF1 y C5. Asimismo, describieron una asociación significativa entre una variante del locus TRAF1-C5 y un riesgo elevado de AR con anti-CCP positivos (Figura 14).

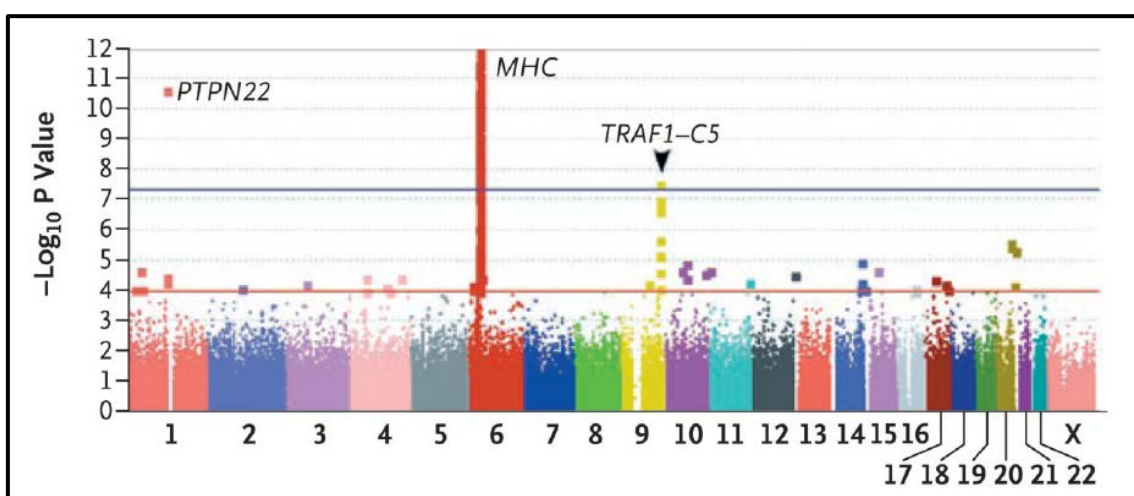


Figura 14. Estudio de asociación de genoma completo en AR¹¹⁵. Genotipado de 297.086 polimorfismos (SNPs) en 1522 pacientes con artritis reumatoide positivos para anti-CCP y 1850 controles procedentes de las cohortes NARAC (North American Rheumatoid Arthritis Consortium) y EIRA (Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis). Se muestra el trazado de los SNPs de acuerdo a su localización en cada cromosoma frente al $-\text{Log}_{10} P$. La línea azul horizontal separa a los SNPs que son significativos a lo largo del genoma ($p=5 \cdot 10^{-8}$). Los SNPs asociados al MHC (donde residen los genes HLA-DRB1) y a PTPN22 alcanzan una asociación significativa. Múltiples SNPs en el locus TRAF1-C5 en el cromosoma 9 también presenta una asociación significativa ($p=2 \cdot 10^{-8}$). El locus TRAF1-C5 contiene dos genes relacionados con la inflamación crónica: TRAF1 que codifica el TNF receptor-associated factor 1 y C5 que codifica el componente 5 del complemento.

2.1.9 Genes no HLA asociados a la Artritis Reumatoide

Los resultados obtenidos con los estudios de ligamiento y asociación son un reflejo de la complejidad de la susceptibilidad genética de la AR. De todos los genes identificados en estos estudios, aquellos más estrechamente relacionados con la AR son el HLA-DRB1 y PTPN22. Sin embargo, diversos estudios han confirmados otros genes relacionados con la enfermedad como STAT4, PAD1-4, TRAF1-C5, la región intergénica 6q23 y el gen IRF-5.

Gen PTPN22: el gen PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) se localiza en el cromosoma 1p13 y codifica una proteína tirosina fosfatasa linfoide (Lyp) expresada en linfocitos. Esta proteína funciona como un regulador negativo de la activación espontánea de los linfocitos T mediante desfosforilación e inactivación de quinasas (tirosina quinasa Csk) y sus sustratos^{116,117} en las rutas de señalización intracelular desencadenada por la unión del TCR en los linfocitos T^{118,119}. Esta proteína Lyp es uno de los más poderosos inhibidores de la activación de linfocitos T.

Un polimorfismo de un solo nucleótico (SNP) en el alelo 1858 del gen PTPN22 (C1858T; sustitución de una citosina 1858C por una timina 1858T) codifica la sustitución de un aminoácido en la posición 620 (R620W; cambio de una arginina R620 por un triptófano W620) de la proteína Lyp afectando a la señalización intracelular a través de las quinasas¹²⁰. Esta variante W620 del gen PTPN22 se une a la quinasa Csk de forma menos eficiente que el alelo R620 lo que se traduce en fallos en la eliminación de linfocitos T auto-reactivos durante el proceso de selección en el timo con un aumento en el número de linfocitos T auto-reactivos. Estos linfocitos T que escapan a una selección negativa persisten en la circulación y los individuos con este polimorfismo W620 son más propensos a fenómenos autoinmunes¹²¹.

La variante W260 del gen PTPN22 es el segundo factor genético de susceptibilidad más importante en la AR. La frecuencia de un SNP en el gen PTPN22 estaba incrementada en pacientes con AR frente a controles sanos en estudios realizados tanto en norteamericanos como europeos caucásicos pero no en coreanos¹²². Este polimorfismo también está asociado con otras enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1, artritis juvenil idiopática, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison y LES. Pero no se encuentra asociación en otras patologías como esclerosis múltiple, psoriasis y artritis psoriásica (PSA)^{120,121,123-125}. El gen PTPN22 es un buen candidato como marcador genético de la susceptibilidad en algunas enfermedades autoinmunes lo que sugiere que existen diferencias en la etiología entre estos dos conjuntos de enfermedades autoinmunes.

Gen STAT4: gen localizado en el cromosoma 2q y que codifica un factor de transcripción Stat4 (signal transducer and activator of transcription 4) que transmite señales inducidas por varias citoquinas entre las que se encuentran IL-12 y IL-23¹²⁶. La diferenciación de las células T colaboradoras tipo 1 (Th1) y la producción de IFN- γ son cruciales en la respuesta inmune mediada por células. En estos procesos, IL-12 es un regulador importante ejerciendo su efecto a través de este factor de

transcripción Stat4¹²⁷. El factor de transcripción Stat4 también está implicado en la diferenciación de células Th17 (células T CD4+ que secretan IL-17) que juegan un papel importante en procesos inflamatorios crónicos a través de señalizaciones mediadas por IL-12 y IL-23¹²⁸.

Una variación alélica de STAT4 confiere un alto riesgo tanto de AR como de LES. A nivel experimental se ha demostrado que ratones deficientes en STAT4 son resistentes a modelos de enfermedades autoinmunes incluyendo artritis. A diferencia de otros genes como PTPN22 y PAD1, STAT4 es el primer gen no-HLA que está asociado con AR tanto en caucásicos como en asiáticos¹²⁹⁻¹³¹.

Gen PAD1-4: gen localizado en 1p36 y que codifica para enzimas dependientes de calcio denominados peptidilarginina desaminasas (PADs) responsables de una modificación post-traducciona l de residuos de peptidilarginina a peptidilcitrulina que constituye una diana antigénica para anticuerpos anti-CCP presentes en muchos pacientes con AR. De los tipos de PAD, los tipos 2 y 4 son los que se consideran que se encuentran más comúnmente en la membrana sinovial donde la citrulinización de las proteínas de la matriz crearía potenciales péptidos antigénicos^{132,133}. Además, los niveles de PAD-2 y PAD-4 están correlacionados con el nivel de inflamación del tejido sinovial en pacientes con AR¹³⁴.

Ciertos polimorfismos de PAD4 se asocian con el desarrollo de AR. En el año 2003, Suzuki y colaboradores estudiaron en una población japonesa los SNPs y observaron asociación entre haplotipos funcionales del gen PADI4 y AR. Identificaron 4 haplotipos de PADI4 estando el haplotipo 2 de PADI4 asociado a un incremento de la susceptibilidad a AR¹³⁵. Sin embargo, estos resultados no se han corroborado en poblaciones europeas como demuestra en estudios realizados en pacientes con AR en Francia¹³⁶, España¹³⁷ y Reino Unido^{138,139}. Sin embargo, un estudio realizado en población coreana confirmó dicha asociación¹⁴⁰.

Estos estudios ponen de manifiesto que algunos de los polimorfismos asociados con la AR presentan diferencias en cuanto al efecto según el grupo étnico. Las variantes asociadas con PAD4 parecen tener un efecto más fuerte en asiáticos del este y un menor efecto en europeos. De forma similar, el alelo de riesgo W620 del gen PTPN22 descrito anteriormente es muy raro en asiáticos y por lo tanto, no juega un papel en la susceptibilidad a la AR en dicha población^{141,142}.

Genes TRAF1-C5: como se ha mencionado previamente, el locus TRAF1-C5 contiene dos genes relacionados con la inflamación crónica: el gen TRAF1 que codifica el TNF receptor-associated factor 1 y el gen C5 que codifica el componente 5 del complemento. Una variante del locus TRAF1-C5 se asoció a un riesgo elevado de AR con anti-CCP positivos¹¹⁵.

Región intergénica 6q23: la región intergénica 6q23 se ha asociado con susceptibilidad a la AR tanto en norteamericanos como en ingleses^{143,144}. La asociación de esta región es compleja con al menos tres variantes independientes que contribuyen a la susceptibilidad a la AR¹⁴⁵.

Gen IRF-5: el gen IRF-5 se asocia con susceptibilidad a la AR y contribuye a la modulación del fenotipo erosivo de la enfermedad. Las variantes genéticas del gen IRF-5 contribuyen a una etiología y patogénesis única de la enfermedad asociada a pacientes con anti-CCP negativos. De hecho, la AR se debería considerar como dos entidades clínicas distintas; una con anti-CCP positivos y otra con anti-CCP negativos que presentarían distinta patogénesis molecular.

2.2 Factores Ambientales

Los factores ambientales de riesgo inciden sobre la base genética predispuesta para iniciar el proceso autoinmune de la enfermedad. Se han propuesto una gran variedad de factores ambientales y asociados al estilo de vida diario que influyen en el desarrollo de la enfermedad aunque la evidencia científica no es concluyente en algunos de ellos^{146,147}. Aunque el hábito tabáquico es el factor ambiental más importante asociado a un mayor riesgo de padecer la enfermedad; en los últimos años y junto al hábito tabáquico ha adquirido importancia la infección por la bacteria *Porphyromonas gingivalis*.

2.2.1 Género y factores hormonales

Las mujeres son de dos a tres veces más susceptibles de desarrollar AR que los hombres, en parte debido a los efectos de estimulación de los estrógenos en el sistema inmune. Los estrógenos inhiben las células T supresoras y realzan la función de las células T colaboradores. Además, el receptor de estrógenos se encuentra presente en las células sinoviales y células T de memoria describiéndose polimorfismos del receptor que se relacionan con la AR^{146,148}.

En mujeres, la presencia de factores hormonales queda reflejada en la mayor susceptibilidad de desarrollar AR durante los años fértiles observándose una mejora en un tercio de los casos durante el embarazo^{149,150}. Además, se ha puesto de manifiesto que una menopausia precoz (edad < 45 años) favorece el desarrollo de AR, señalando la influencia de cambios hormonales durante el periodo fértil en el desarrollo de AR en mujeres post-menopáusicas¹⁵¹. En mujeres con una lactancia prolongada por más de 12 meses se observó una disminución en el riesgo de desarrollar AR¹⁵². El efecto de la lactancia prolongada es dosis dependiente con una tendencia significativa hacia un menor riesgo cuando mayor es la duración del periodo de lactancia¹⁵³.

En hombres con AR se observaron niveles de hormonas sexuales masculinas disminuidas, sobre todo testosterona, comparado con controles sanos mientras que en mujeres con AR no se observaron diferencias en los niveles de hormonas sexuales comparado con controles sanos^{154,155}. En otro estudio se han encontrado también niveles más bajos de la hormona DHEA y niveles más altos de estradiol en hombres con AR, correlacionándose este último con el grado de inflamación¹⁵⁶. Sin embargo, no está claro si los cambios en los niveles hormonales en hombres son resultado de la inflamación crónica o los hombres con niveles alterados de testosterona y estrógenos presentan un riesgo elevado de desarrollar AR.

El género ejerce una influencia importante en el fenotipo de la enfermedad incluyendo la edad de inicio de la AR y la producción de autoanticuerpos. Comparados con mujeres, los hombres presentan una edad de inicio de la enfermedad más tardía, son más propensos a tener FR positivo y presentan mayores títulos de anti-CCP¹⁵⁷.

2.2.2 Factores dietéticos

Se ha estudiado la implicación de la vitamina D en la etiología de muchas enfermedades autoinmunes como LES, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. La vitamina D presenta varios efectos en el sistema inmune entre los que destacan la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias, estimulación de citoquinas anti-inflamatorias y regulación del sistema inmune innato y adaptativo a través del receptor de la vitamina D¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Algunos estudios ponen de manifiesto la asociación inversa entre el consumo de vitamina D y el riesgo de padecer AR y entre los niveles séricos de vitamina D y la evolución de la enfermedad¹⁶². Patel y colaboradores encontraron una

relación inversa entre los niveles del metabolito 25-hidroxivitamina D (25[OH]D) y los marcadores de gravedad de la enfermedad como el número de articulaciones inflamadas, el índice de actividad compuesto DAS28 y el índice de discapacidad física HAQ¹⁶³. Resultados similares se encontraron en otro estudio donde los niveles de 25[OH]D estaban inversamente relacionados con el DAS28, HAQ y la evaluación global de la enfermedad por el paciente¹⁶⁴. Sin embargo, el papel de la vitamina D en el desarrollo de la AR no está completamente definido ya que otros estudios no muestran dicha relación entre el consumo de vitamina D y el desarrollo de AR¹⁶⁵.

El consumo de ácidos grasos omega 3 marinos ejerce el efecto a través de las vías de las prostaglandinas y leucotrienos disminuyendo los mediadores de inflamación. Varios estudios señalan que el consumo de pescado presenta un efecto protector modesto en el riesgo a desarrollar AR, mejora los síntomas y retrasa la progresión de la enfermedad¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. El efecto protector de los ácidos grasos se apreciaría en la dieta mediterránea donde es frecuente el consumo de pescados y aceite de oliva. No se ha observado una asociación entre el consumo de carne roja y el riesgo a desarrollar AR¹⁷¹.

2.2.3 Consumo de café

Se han realizado varios estudios para ver el efecto del consumo de café sobre la AR. Pero en estos estudios basados en el consumo de café no se han encontrado resultados concluyentes, sino todo lo contrario ya que son discrepantes. Karlson y colaboradores en un estudio prospectivo realizado en mujeres y durante un periodo de 20 años no encontraron asociación entre el consumo de café total, café con cafeína, café descafeinado, té y cafeína con el riesgo de desarrollar AR¹⁷².

Sin embargo, en otro estudio se observó que el consumo de café descafeinado estaba asociado al desarrollo de AR mientras que el consumo de té presentaba una asociación inversa¹⁷³. Pedersen y colaboradores encontraron que el consumo elevado de café (>10 tazas /día) estaba asociado al riesgo de RA con anti-CCP positivos¹⁷⁴.

2.2.4 Consumo de alcohol

El consumo de alcohol se asocia a un efecto protector sobre la AR disminuyendo tanto el riesgo de desarrollar la enfermedad¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ como el riesgo de

progresión en pacientes con AR evidenciado por una menor progresión radiográfica en consumidores de alcohol frente a no consumidores¹⁷⁸.

El consumo de alcohol exhibe un efecto protector dosis dependiente (no consumo, consumo bajo, moderado y alto). En dos estudios casos-control se observó que el consumo de alcohol está asociado con una atenuación del efecto del hábito tabáquico y del EC HLA-DRB1 respecto a desarrollar AR con anti-CCP positivos¹⁷⁴. En un estudio reciente el consumo moderado de alcohol estuvo asociado con un riesgo reducido de AR (OR=0,48; IC95% 0,22–1,05) mientras que el consumo infrecuente de alcohol fue un predictor de AR (OR=3,47; IC95% 1,91–6,30)¹⁷⁹.

2.2.5 Exposición a agentes ocupacionales

La exposición ocupacional al polvo y a las fibras puede incrementar el riesgo de desarrollar AR. La exposición a polvo de sílice se asoció a un riesgo incrementado de desarrollar AR según un estudio realizado en Suecia en hombres que han trabajado en la industria minera y de la construcción. Esta asociación fue independiente del hábito tabáquico¹⁸⁰. Una alta exposición al polvo de sílice puede causar inflamación crónica y fibrosis en los pulmones y otros órganos tal que la inflamación conduciría a una respuesta inmune humoral y por lo tanto un mayor riesgo de AR seropositiva.

Posteriormente, en un estudio realizado en hombres en contacto con el polvo de sílice, se concluyó que la exposición a la sílice combinado con el hábito tabáquico presentó un riesgo elevado de desarrollar AR seropositiva para anti-CCP (OR=7,36; IC95% 3,31-16,38) pero no para AR seronegativa (OR=1,16; IC95% 0,35-3,87). Estos resultados sugieren que diferentes exposiciones por inhalación pueden interactuar con efecto aditivo o sinérgico en la etiología de la AR seropositiva para anti-CCP¹⁸¹.

2.2.6 Factores socioeconómicos

El estatus socioeconómico influye en el curso de la enfermedad aunque también podría influir en el riesgo de padecer AR. Bengtsson y colaboradores encontraron una asociación inversa entre el estatus socioeconómico y el riesgo de desarrollar AR en un estudio de casos y controles en Suecia¹⁸². En dos estudios se ha encontrado que un bajo estatus socioeconómico junto con el hábito tabáquico son factores independientes de riesgo en AR^{179,183}.

2.2.7 Agentes infecciosos

Los agentes infecciosos tanto virus (Epstein-Barr, Parvovirus B19) como bacterias (*Proteus mirabilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* y algunas especies de *Mycoplasma*) están considerados como posibles factores desencadenantes de la AR¹⁸⁴⁻¹⁹⁰. Sin embargo los resultados obtenidos no han generado suficiente evidencia de la implicación de la mayoría de agentes infecciosos en la contribución a la AR.

Algunos virus y bacterias presentan secuencias de péptidos idénticas a los autoantígenos, por lo que la infección con esos agentes pueden llegar a inducir una respuesta inmune que produce una reacción cruzada con el autoantígeno denominada mimetismo molecular. Esta hipótesis explicaría la inducción de la autoinmunidad por estos agentes infecciosos (Figura 15). Varios hallazgos respaldan la asociación entre el virus de Epstein Barr (EBV) y la AR:

- El EBV es un activador policlonal de las células B, incluyendo aquellas que expresan el FR.
- Los pacientes con AR presentan una respuesta inmune humoral y celular incrementada a ciertos antígenos de EBV, *Brucella ovis* y *Lactobacillus lactis* que expresan la secuencia QKRAA. Dicha secuencia es la misma encontrada en el EC¹⁹¹.
- Los pacientes con AR pueden presentar una carga viral de EBV incrementada. Esto quedó demostrado en un estudio donde se encontró que los pacientes con AR tenían una carga de DNA de EBV incrementada en 10 veces comparada con controles sanos. Esta carga de DNA permaneció estable durante el tiempo y no se modificó durante el tratamiento de los pacientes con FARMES¹⁹².

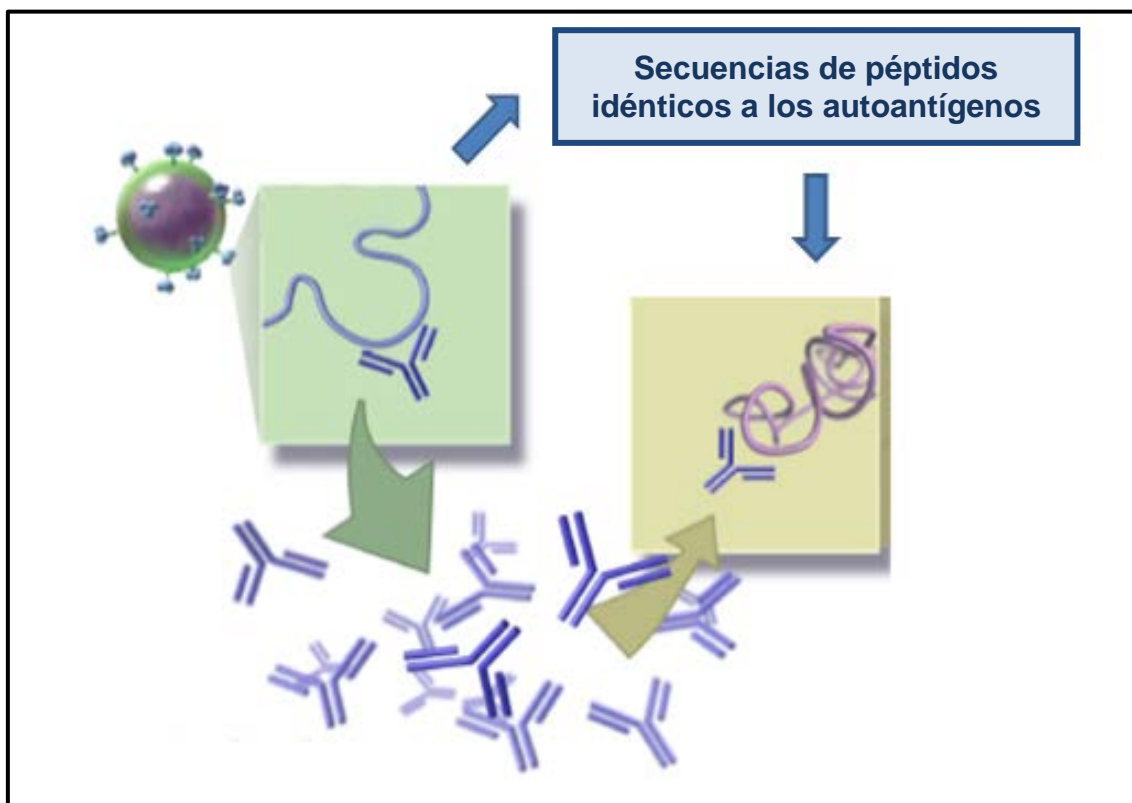


Figura 15. Teoría del mimetismo molecular. Algunos virus o bacterias pueden presentar una secuencia proteica en su estructura que es similar a autoantígenos presentes en el individuo. La infección por estos microorganismos activa a las células T dando lugar a una respuesta inmune por producción de anticuerpos específicos por las células B. Sin embargo, estos anticuerpos responderán también hacia el autoantígeno como si se tratara del agente infeccioso mediante un fenómeno de mimetismo molecular al presentar ambos secuencias peptídicas idénticas.

Los superantígenos son proteínas con capacidad de activar múltiples clones de células T a través de un proceso independiente del MHC. Ejemplo de superantígenos lo encontramos en ciertas endotoxinas secretadas por estafilococos y en las proteínas de choque térmico (HSPs). Éstas últimas son proteínas inducidas por agresiones ambientales como el calor, agentes infecciosos o daño oxidativo. La primera descripción de la asociación entre HSPs, infección y AR se observó en un estudio sobre artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas¹⁹³. La artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas es uno de los modelos farmacológicos más comúnmente utilizado para la evaluación de medicamentos efectivos en el tratamiento de esta enfermedad.

La hipótesis más factible que implicaría a las HSPs como factor causante de AR reside en que esas proteínas comparten determinantes antigénicos con otras proteínas y resultarían en el desarrollo de reactividad cruzada (por mimetismo

molecular) con anticuerpos que podrían inducir una respuesta autoinmune. Ejemplos lo encontramos en dos proteínas que presentan la secuencia QKRAA del EC: gp110 de EBV y dnaJ de *Escherichia coli*. La molécula dnaJ es una HSPs que es fuertemente antigénica. Los anticuerpos específicos contra dnaJ presentan una reactividad cruzada con células positivas para DRB1*0401 pero no para células que expresan otros alelos¹⁹⁴.

El papel de la periodontitis y la infección por bacteria *Porphyromonas gingivalis* en la AR se desarrollará en un apartado ulterior dedicado a la citrulinización.

2.2.8 Hábito Tabáquico

El hábito tabáquico juega un rol crucial en la patogénesis de muchas enfermedades que afectan a una gran proporción de la población mundial como aterosclerosis, cáncer de pulmón, enfermedad coronaria y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El humo de cigarro consiste en una mezcla de más de 4000 sustancias tóxicas entre las que se incluyen la nicotina, agentes carcinógenos, compuestos orgánicos, solventes, radicales libres y monóxido de carbono¹⁹⁵.

En los últimos años, el tabaco también se ha asociado a enfermedades autoinmunes como AR¹⁹⁶, LES¹⁹⁷, esclerosis múltiple^{198,199}, cirrosis biliar primaria²⁰⁰, espondilitis anquilosante²⁰¹, PSA²⁰² y enfermedad de Crohn²⁰³. El consumo de tabaco afecta a la respuesta inmune tanto humoral como celular y podría tener efectos pro-inflamatorios e inmunosupresores.

2.2.8.1 Hábito Tabáquico y desarrollo de Artritis Reumatoide

Vessey describió por primera vez y de forma inesperada una asociación entre el hábito tabáquico y la primera derivación al hospital por AR en un estudio sobre el efecto de los anticonceptivos orales en la enfermedad²⁰⁴. Desde este primer estudio y hasta la fecha se han realizado múltiples trabajos tanto de cohortes como de casos y controles que ponen de manifiesto la importancia del tabaquismo en la AR^{196,205-214}.

Índice de Tabaquismo (paquetes/año)

$$IT = \frac{(\text{numero de cigarros al día}) * (\text{años fumando})}{20}$$

1 paquete/año = 1 paquete al día durante un año

20 paquetes/año = 1 paquete al día durante 20 años

Punto de corte >20 paquetes/año
Grandes fumadores

Figura 16. Índice de tabaquismo. El índice de tabaquismo (IT) se define como el producto entre el “número de cigarros fumado al día” y los “años que lleva fumando” dividido por el valor numérico de 20. Se expresa en paquetes/año y se ha establecido un punto de corte superior a 20 paquetes/años para definir a grandes fumadores.

A fecha de hoy, el tabaco está considerado como el principal factor ambiental asociado a un riesgo elevado de padecer AR. Pero no sólo eso, sino que también influye en la evolución clínica del paciente. Tanto la duración como la intensidad del hábito tabáquico están relacionadas con el desarrollo de AR:

- Un estudio de casos y controles demostró que las mujeres con un índice de tabaquismo de 20 paquetes/año o superior presentan un riesgo mayor de parecer AR frente a no fumadoras²¹⁵.
- Un estudio similar realizado en mujeres trabajadoras en hospitales demostró que las mujeres que fuman más de 25 cigarros al día durante más de 20 años (>25 paquetes/año) experimentaron un riesgo incrementado de padecer AR. Concluyeron que la duración pero no la intensidad del hábito tabáquico estaba asociado a un riesgo incrementado de AR²¹⁶.
- Otro estudio ha demostrado una fuerte asociación entre AR y un hábito tabáquico elevado (historial de 41 a 50 paquetes/año) en pacientes sin historia familiar de AR²⁰⁷.

Como destacan estos estudios, tanto los años de consumo de tabaco como la cantidad diaria de cigarrillos fumados son factores de riesgo para la AR; pero la duración del hábito tabáquico (≥ 20 años) parece ser un factor más decisivo que la intensidad. No obstante, al menos es necesario 10 años sin fumar para reducir el riesgo de padecer AR. Incluso se ha observado en algún estudio que se precisarían 20 años sin fumar para reducir el riesgo^{212,214,216}.

El efecto del tabaco se manifiesta en ambos géneros. Olsson y colaboradores encontraron que tanto hombres como mujeres fumadores activos tenían un riesgo incrementado de AR (OR=2,9 con IC95% 1,4-6,4 y OR=1,8 con IC95% 1,1-2,9; respectivamente). En ex fumadores, el efecto sólo se observó en hombres (OR=2,3; IC95% 1,2-4,4)²¹⁷.

En un meta-análisis Sugiyama y colaboradores concluyeron que el tabaco es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la AR siendo el riesgo mayor en hombres que en mujeres. Este riesgo de desarrollar AR fue dos veces mayor en hombres fumadores frente a no fumadores; mientras que en mujeres fue 1.3 veces mayor. Sin embargo, en grandes fumadores (≥ 20 paquetes/año) parece que el riesgo se invierte y es superior para mujeres que para hombres²¹⁸.

2.2.8.2 Hábito Tabáquico y severidad de la enfermedad

El tabaco también se relaciona con la severidad de la enfermedad. Un estudio puso de manifiesto que el hábito tabáquico y especialmente un índice superior a 25 paquetes/año se correlacionó de modo significativo con un FR positivo, presencia de erosiones y nódulos reumatoides²¹⁹. En varios estudios se observaron que el hábito tabáquico incrementó la presencia de manifestaciones extraarticulares como nódulos reumatoides, vasculitis y enfermedad pulmonar intersticial²²⁰⁻²²³.

Sin embargo, encontramos discrepancias ya que aunque la mayoría de estudios indican que los pacientes fumadores presentan una AR con una peor evolución definida por mayor actividad y discapacidad de la enfermedad, otros estudios señalan que la evolución de la enfermedad es similar en fumadores y no fumadores, como puede observarse a continuación.

En los primeros estudios realizados para abordar el efecto del tabaquismo sobre la progresión radiográfica en pacientes con AR de larga evolución se observó una mayor progresión de lesiones radiográficas en los pacientes fumadores^{219,224-226}. En una cohorte de mujeres con AR se observó un mayor daño radiológico evaluado por el índice de Larsen y un nivel mayor de discapacidad medido por el parámetro HAQ en pacientes fumadores comparados con pacientes no fumadores²²⁷. No obstante, en estudios posteriores ya se encontraron resultados discordantes donde la progresión radiológica de la enfermedad no estaba influida por el hábito tabáquico²²⁸⁻²³⁰.

En uno de estos estudios discordantes, Westhoff y colaboradores revelaron que el hábito tabáquico no influyó en el marcador de actividad DAS28 ni en los índices de puntuación radiográfica pero los fumadores necesitaron más dosis o combinaciones de FARMES, incluso terapia biológica. Esto indicaría un reducido potencial de esos fármacos debido al tabaco o una mayor actividad de la AR que sólo podría ser controlado con una mayor dosis de FARMES²²⁹. Otros estudios han confirmado que los pacientes fumadores responden peor a los FARMES, especialmente MTX.

En un reciente estudio realizado en seis cohortes para determinar el efecto del tabaco en la progresión del daño articular se observó que aunque los fumadores presentaban un daño articular mayor; el efecto del tabaco sobre el daño articular estaba mediado vía anti-CCP y el tabaco no era un factor independiente para la progresión radiológica en AR²³¹.

2.2.8.3 Hábito Tabáquico, factor reumatoide y epítipo compartido

Desde hace tiempo se conoce que el consumo de tabaco está asociado a la producción de FR^{232,233}. En los primeros trabajos donde se estudió la relación entre el hábito tabáquico y la AR se observó la existencia de una mayor frecuencia de FR positivo y títulos más elevados en pacientes fumadores frente a no fumadores^{224,234}. En el estudio de Stolt y colaboradores; fumadores actuales, ex fumadores y fumadores ocasionales de ambos sexos presentaron un mayor riesgo de desarrollar AR con FR positivo pero no AR con FR negativo comparado con no fumadores. Este riesgo sólo se observó entre sujetos que habían fumado 20 años o más (RR=2,6; IC95% 1,8-3,6) y fue evidente con una intensidad de 6-9 cigarros/día (RR=2,6; IC95% 1,3-4,7)²³⁴.

En un estudio posterior, se confirmaron estos resultados en sujetos fumadores donde el riesgo de desarrollar AR con FR positivo es mayor que el riesgo de desarrollar AR con FR negativo y además dicho riesgo estaba modificado por el género²³⁵. En otro estudio se observó una correlación positiva entre el hábito tabáquico y los niveles de FR. El isotipo IgA estuvo asociado a una enfermedad más severa²²⁵. Westwood y colaboradores han sugerido que la AR con FR positivo difiere de aquella que presenta el FR negativo²³⁶.

En un estudio con pacientes con AR de inicio reciente, el hábito tabáquico estuvo asociado con una mayor actividad de la enfermedad y mayores niveles de FR IgA durante los dos primeros años. Además, la positividad para el FR IgA y no para el isotipo IgM predijo un peor pronóstico en estos pacientes²²⁸. El FR es comúnmente determinado por un test que determina el isotipo IgM pero varios estudios han indicado que el isotipo IgA puede ser un mejor indicador pronóstico en los pacientes con AR^{237,238}.

El tabaquismo es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la AR, particularmente en individuos portadores de los alelos HLA-DRB1 del EC. Esta afirmación quedó demostrada en un estudio de casos y controles realizado en Suecia, donde se observó una interacción genética-ambiental entre el consumo de tabaco y los alelos del EC en el desarrollo de AR con FR positivo. El RR de AR con FR positivo fue alto con un valor de 7,5 (IC95% 4,2-13,1) en fumadores actuales con alelos del EC. Aquellos fumadores con una copia de los alelos del EC presentaron un RR de 5,5 (IC95% 3,0-10,0) mientras que en aquellos fumadores con dos copias de los alelos del EC el RR fue muy alto con un valor de 15,7 (IC95% 7,2-34,2). Sin embargo, no se encontró asociación entre el hábito tabáquico, los alelos del EC o la interacción entre ambos en el desarrollo de AR con FR negativo²³⁵.

3

Citrulinización. Hipótesis del epítipo compartido citrulinado

Como se ha expuesto en el apartado anterior, la AR es una enfermedad autoinmune que presenta una compleja etiología donde influyen tanto factores genéticos como ambientales. El descubrimiento de los anticuerpos contra proteínas y/o péptidos citrulinados ha modificado la hipótesis del papel de los alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC como factor de susceptibilidad en AR.

3.1 Citrulinización

Los anti-CCP son anticuerpos que van dirigidos contra secuencias peptídicas que han sufrido un proceso de citrulinización. En estas secuencias peptídicas, el determinante antigénico es un residuo de citrulina que es un aminoácido no esencial producido vía modificación postraduccional de la arginina por acción de la enzima peptidil arginil desaminasa (PAD). Dicha enzima se activa en los procesos de apoptosis e inflamatorios y requiere la movilización de calcio libre (Ca^{2+}) para su actividad²³⁹ (Figura 17).

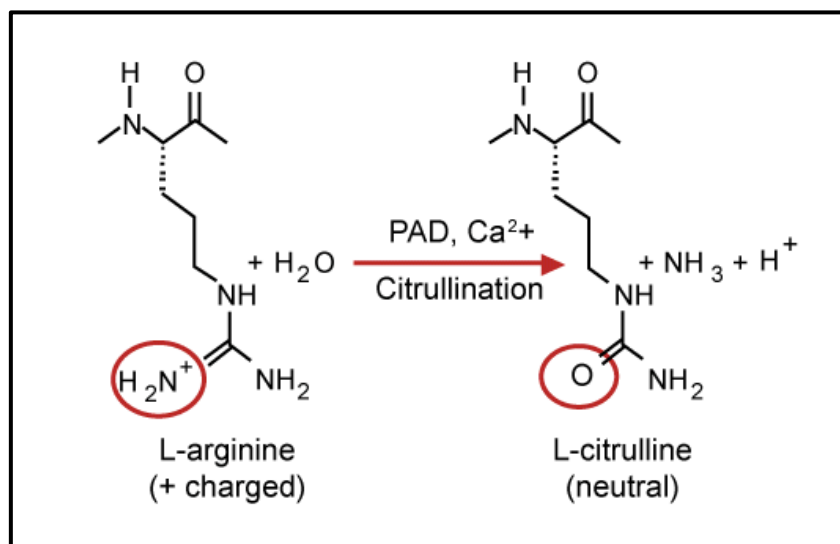


Figura 17. Conversión de la arginina a citrulina por acción de la peptidilarginil desaminasa (PAD)²³⁹. La citrulinización constituye un cambio postraduccional producido por la enzima peptidilarginina deaminasa (PAD) sobre residuos de arginina produciendo citrulina. Se pasa de un residuo con carga positiva a otro con carga negativa.

En presencia de altas concentración de calcio (por ejemplo, cuando las células mueren por apoptosis) esta enzima, que se encuentra presente en monocitos y granulocitos, convierte el grupo amino con carga positiva de la arginina en un grupo carbonilo sin carga de la citrulina. De este modo, la citrulinización produce un pequeño cambio en la masa molecular y la pérdida de una carga positiva en las proteínas modificadas.

La enzima PAD presenta varias isoformas de las cuales se ha descrito cinco en mamíferos y con una distribución característica: PAD1-4 y PAD6. PAD1 y PAD3 se encuentran principalmente en la epidermis y folículo piloso mientras que PAD2 se expresa en varios tejidos como músculo, cerebro y células hematopoyéticas. PAD4 (anteriormente conocida como PAD5) se encuentra principalmente en células hematopoyéticas (granulocitos, monocitos y macrófagos). En los pacientes con AR se encuentran en abundancia durante el proceso de inflamación sinovial las isoformas PAD2 y PAD4. Estas isoformas se localizan en el citoplasma de las células donde la concentración de Ca^{2+} es muy baja²³⁹.

La citrulinización es un proceso fisiológico que ocurre dentro de las células que van a experimentar apoptosis. Estas células son reconocidas y eliminadas por células del sistema inmune como macrófagos. Pero en los procesos inflamatorios cuando las células mueren por necrosis se rompe la membrana celular liberándose las PAD al espacio extracelular donde las concentraciones de Ca^{2+} son elevadas. Esto provoca la activación de las PAD y son capaces de citrulinar proteínas y secuencias peptídicas. En la sinovial inflamada existen macrófagos que expresan PAD2 y granulocitos con PAD4 que citrulinizan proteínas extracelulares como el fibrinógeno²⁴⁰ o intracelulares como la vimentina²⁴¹.

Esta citrulinización de proteínas y péptidos permite que tanto la filagrina como otras proteínas presentes en la articulación como vimentina, colágeno tipo II o fibrina sean reconocidas por el sistema inmune dando lugar a la correspondiente respuesta inmunológica con producción de anticuerpos en el contexto de una posible predisposición genética y con intervención de factores ambientales como veremos a continuación.

Los productos de la citrulinización no sólo se han identificado en la sinovial inflamada sino también en otros tejidos sometidos a situaciones de estrés como los pulmones de los fumadores²⁴² y las encías de sujetos con periodontitis²⁴³.

3.2 Hipótesis del Epítipo Compartido Citrulinado

En base a la presencia de residuos con carga positiva en el EC existe la hipótesis de que las moléculas HLA que contienen el EC se unirían preferentemente a péptidos que tienen carga negativa o son no polares en la posición de anclaje p4. Un estudio en ratones transgénicos para el alelo HLA-DRB1*0401 señaló que el EC puede estar implicado en la iniciación de una respuesta autoinmune hacia autoantígenos citrulinados. La conversión de arginina a citrulina en un péptido modelo seleccionado, en la posición que interactúa con el EC, incrementó la afinidad de la unión del péptido con el MHC lo que conduciría a una eficiente activación de las células T CD4+ en esos ratones. Estos resultados señalan que la citrulinización podría influir en la inmunogenicidad y antigenicidad de las proteínas.

La citrulinización de péptidos podría incrementar la afinidad de los péptidos citrulinados por las moléculas HLA-DRB1 del EC²⁴⁴. Estos péptidos citrulinados podrían corresponderse con los péptidos artritogénicos que se unen a las moléculas del EC para su presentación a las células T descritos en la teoría del EC de Gregersen⁵⁸.

En la última década se ha propuesto que los alelos del EC se asocian con un subgrupo de pacientes con AR y anti-CCP positivos. De esta manera, se ha demostrado que los alelos HLA-DRB1 predisponen exclusivamente al desarrollo de AR con anti-CCP positivos y no al de AR con anti-CCP negativos. Huizinga y colaboradores observaron que en pacientes con AR con anti-CCP positivos; el OR que describe la asociación de dos copias de alelos del EC con anti-CCP positivos fue de 11,7 (IC95% 6,5-21,1; $p < 0,0001$) mientras que para un solo alelo del EC fue de 4,3 (IC95% 2,8-6,6; $p < 0,0001$). No se observó dicha asociación en los pacientes AR con anti-CCP negativos donde los OR correspondientes a una y dos copias de alelos fueron de 1,2 (IC95% 0,9-1,8) y 1,3 (IC95% 0,7-2,6) respectivamente²⁴⁵ (Tabla 5).

Además, el FR y los anti-CCP con frecuencia suelen ocurrir simultáneamente y el EC también está asociado al FR. Se ha analizado si esas asociaciones son independientes. El resultado ha mostrado que la asociación entre EC y FR es

secundaria a la asociación entre EC y anti-CCP^{245,246}. En una cohorte de pacientes con Artritis Indiferenciada (AI) se observó que el EC no contribuye independiente hacia la progresión a AR pero si al desarrollo de anti-CCP. El EC estaba asociado a niveles más altos de dichos anticuerpos²⁴⁶.

EC	Controles (n=423)	AR con anti-CCP positivos (n=195)		AR con anti-CCP negativos (n=213)	
	n (%)	n (%)	OR (IC95%)	n (%)	OR (IC95%)
+ / +	26 (6)	49 (25)	11,7 (6,5-21,1)	16 (8)	1,3 (0,7-2,6)
+ / -	153 (6)	107 (55)	4,3 (2,8-6,6)	88 (41)	1,2 (0,9-1,8)
- / -	244 (58)	39 (20)	1,0	109 (51)	1,0

Tabla 5. Distribución de los alelos del EC y positividad para los anti-CCP²⁴⁵. Se ha empleado la ausencia de copias de alelos del EC en los controles sanos como grupo de referencia. Los alelos siguientes fueron clasificados como EC positivo: DRB1*0101, *0102, *0104, *0401, *0404, *0405, *0408, *0413, *0416, *1001 y *1402.

Un hecho importante de los anti-CCP es que pueden aparecer antes del comienzo de la clínica de la enfermedad, incluso años sin que se observen signos clínicos de artritis. Una vez que están presentes, la probabilidad de desarrollar AR es muy alta sugiriendo una íntima relación entre la inmunidad contra antígenos citrulinados y AR. Esto implicaría que la producción de anti-CCP y el desarrollo de la AR serían dos eventos distintos^{247,248}.

Estos resultados expuestos apoyan fuertemente la hipótesis de que las moléculas HLA que contienen los alelos del EC jugarían un rol importante en la activación de las células T CD4+ de forma preferente mediante la presentación de antígenos citrulinados y generando una respuesta inmunológica con producción de anticuerpos frente a esos antígenos citrulinados²⁴⁹.

En base a estos y otros estudios se ha formulado un nuevo modelo para la patogénesis de la AR en las que el EC y los anti-CCP juegan un rol fundamental y donde intervienen factores genéticos y ambientales^{245,249-253}. Este **“Modelo del Epítipo Compartido Citrulinado”** consta de dos fases bien diferenciadas.

En la primera etapa tiene lugar la inducción de anti-CCP. Como se ha descrito previamente, la citrulinización es un proceso fisiológico que ocurre durante la

apoptosis en múltiples localizaciones del cuerpo^{254,255}. No obstante, la citrulinización también puede ocurrir durante la inflamación o por acción de factores ambientales y este proceso resultaría en la generación de neo-epítopos citrulinados que a diferencia de las proteínas citrulinadas generadas de manera fisiológica ocurren de forma extracelular^{247,256}. Precisamente, en esta primera etapa la citrulinización de las proteínas iniciaría una respuesta de las células T restringida a las moléculas de HLA clase II pero sólo en individuos con EC positivo. Posteriormente, las células T ayudarían a las células B a secretar anti-CCP²⁴⁹. La presencia de anti-CCP puede preceder varios años el desarrollo de la AR.

En la segunda etapa tiene lugar una expresión de antígenos citrulinados en la articulación que está inflamada. La expresión de antígenos citrulinados en las articulaciones inflamadas sería reconocida por los anti-CCP generados en la etapa anterior. Este reconocimiento daría lugar a la formación de inmunocomplejos y activación de la vía del complemento con atracción y activación de granulocitos, monocitos, macrófagos y mastocitos. La respuesta inmunológica entraría en un círculo vicioso donde la inflamación produciría más antígenos para ser procesados y con una posible perpetuación de la respuesta como resultado^{249,251}.

Aunque la inflamación es un fenómeno relativamente abundante en la vida diaria, sólo un porcentaje de la población inferior al 1% desarrolla anti-CCP. Esto es debido a que tanto la acumulación de factores genéticos como ambientales son necesarios para el desarrollo de antígenos citrulinados y posterior producción de anti-CCP.

3.3 Hábito tabáquico, epítipo compartido y citrulinización

Klareskog y colaboradores postularon que el tabaco en el contexto del EC HLA-DRB1 puede desencadenar reacciones inmunes restringidas a antígenos modificados por citrulinización²⁵⁷: la reacción inflamatoria local y necrosis que produce el tabaco a nivel pulmonar originaría una citrulinización de proteínas. Estas proteínas citrulinadas constituirían el sustrato para la activación de una respuesta inmune local con producción de anti-CCP. Estos acontecimientos corresponderían con la fase de inducción de anti-CCP del modelo del EC citrulinado (Figura 18).

Posteriormente, ante la presencia de un proceso inflamatorio articular se produciría la citrulinización de péptidos y proteínas formándose inmunocomplejos con los anti-CCP circulantes que desencadenaría una respuesta inmune con liberación de mediadores de inflamación como interleucinas y TNF- α (que se corresponde con la segunda etapa del modelo del EC citrulinado)²⁵⁸.

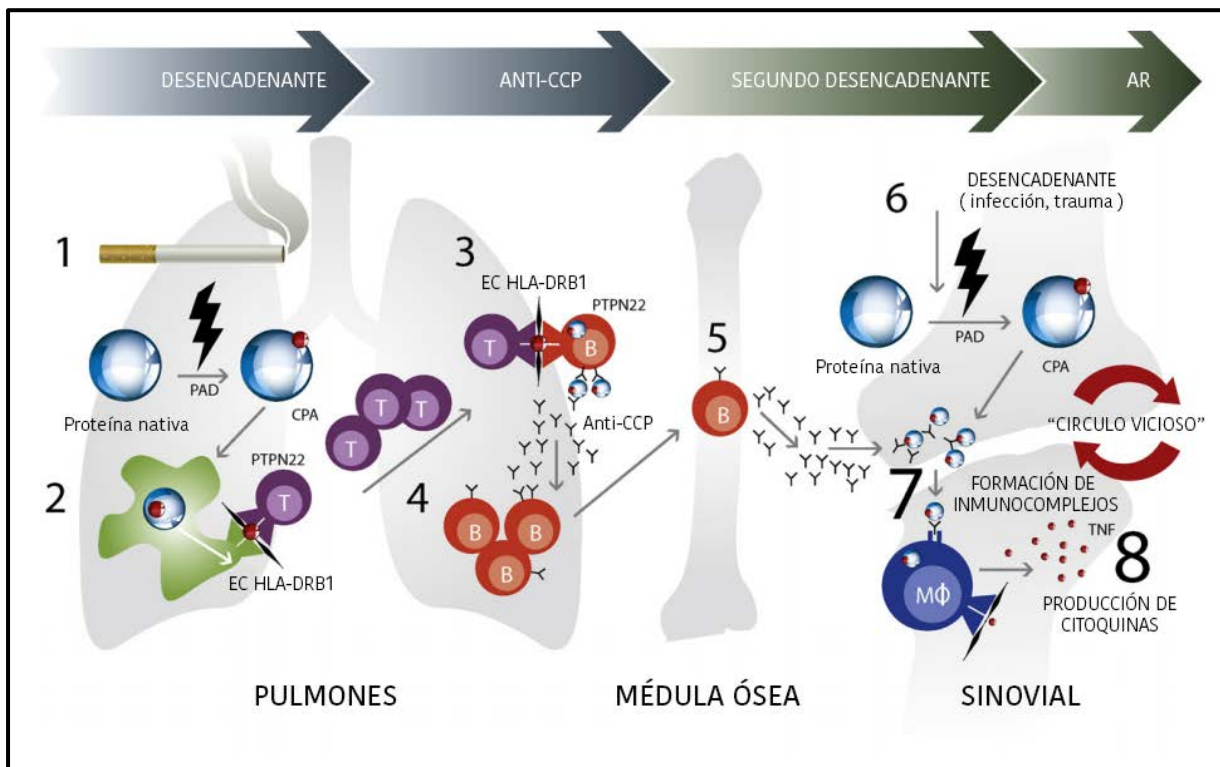


Figura 18. Hipótesis etiológica del modelo de desarrollo de una AR con anti-CCP positivos desde un estado pre-enfermedad a una poliartritis crónica que cumple los criterios de AR. 1.La exposición durante un tiempo prolongado al humo de tabaco actúa como el desencadenante que induce la activación local de enzimas PAD con la consiguiente citrulinización de péptidos y proteínas presentes en los pulmones. 2.La activación de las células presentadoras de antígenos en respuesta a señales de peligro derivadas de los componentes tóxicos del tabaco, conduciría a un aumento en el consumo, procesamiento y presentación de péptidos citrulinados (CPA) a las células T CD4+ en el contexto del EC HLA-DRB1 y que iniciarían una proliferación y diferenciación con producción de citoquinas y formación de células T de memorias CPA-específicas. 3.Activación de células B CPA-específicas mediado por las células T CD4+. 4.Proliferación y diferenciación de células B CPA-específicas con producción de anti-CCP. 5.Formación de células B de memoria CPA-específicas. 6.Un segundo evento inflamatorio tiene lugar a nivel sinovial en las articulación con activación local de enzimas PAD y citrulinización de proteínas y péptidos sinoviales. 7.Tras el reclutamiento de anti-CCP de múltiples especificidades en la articulación tienen lugar la formación de inmunocomplejos CPA-anti-CCP. Los complejos CPA-anti-CCP se unen a los receptores Fc expresados en las células presentadoras de antígeno lo que conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (principalmente TNF) y un incremento de la presentación de CPA en el contexto del EC HLA-DRB1. Esto conduce a una activación adicional de células T patógenas y células B que incrementan la producción de anti-CCP. 8.Se establece un círculo vicioso con inflamación crónica de la sinovial y el desarrollo de AR. Tomado y traducido de Klareskog y cols²⁵⁹.

Basándose en dicha hipótesis, se estudió la presencia de proteínas y péptidos citrulinados en las células del BAL de fumadores (sanos y con inflamación pulmonar) y no fumadores sanos. Se observó que los fumadores presentaron un mayor porcentaje de macrófagos que los no fumadores en el BAL (94% vs 89%). En el BAL de los fumadores sanos se detectó un 13,7% de células positivas para citrulina mientras que para los fumadores con inflamación pulmonar este porcentaje fue mayor con un valor de 28,5%. En los no fumadores sanos no se encontraron células positivas para anticuerpos contra proteínas citrulinadas²⁵⁷. En un estudio posterior, se encontró un aumento significativo en la expresión de PAD2 en las células bronquioalveolares del BAL de fumadores frente a no fumadores sanos²⁶⁰.

En los resultados de Klareskog y colaboradores se puso de manifiesto la existencia de una interacción entre los alelos del EC y uno de los principales factores ambientales implicados en la AR, el tabaquismo. Dicha interacción, predispone a la presencia de anti-CCP (Figura 19).

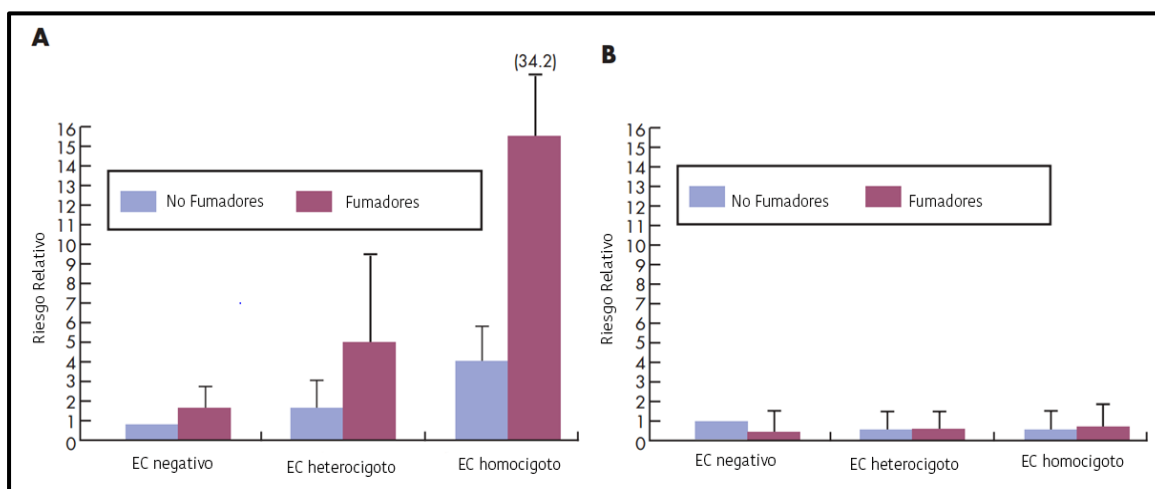


Figura 19. Riesgo relativo (RR) para el desarrollo de AR en fumadores actuales con diferentes número de copias de alelos del EC comparado con no fumadores. Número de copias de alelos del EC: negativo (0 copias), heterocigoto (1 copia), homocigoto (2 copias). **(A)** RR para AR seropositiva para anti-CCP. **(B)** RR para AR seronegativa para anti-CCP. Tomado y traducido de Klareskog y cols²⁶⁶.

El tabaquismo se encuentra fuertemente asociado con los anti-CCP^{174,261}. En un estudio se demostró que la exposición al tabaco incrementa el riesgo de anti-CCP pero sólo en pacientes con EC positivo. Esta interacción entre tabaquismo y EC que conduce a anti-CCP fue específica para la AR y no se observó en la AI. Este efecto también se encontró con el FR pero la interacción tabaquismo-EC está principalmente asociada a los anticuerpos anti-CCP²⁶².

La presencia de dos copias de los alelos del EC multiplica por veinte el riesgo de AR con anti-CCP positivos en fumadores²⁵⁷. Este riesgo se manifiesta especialmente en fumadores intensos²⁶³. Los alelos HLA-DRB1*0401, *0404, *0405 y *0408 confieren el mayor riesgo de desarrollar anti-CCP y la interacción entre tabaquismo y EC fue mayor en el caso de los alelos HLA-DRB1*0101, *0102 y *1001²⁶⁴. En un estudio llevado a cabo en Francia en un grupo de 274 pacientes con AR, la presencia de al menos de un alelo del EC (especialmente el alelo DRB1*0401) se relacionó con la presencia de anti-CCP; el hábito tabáquico estaba asociado con los anti-CCP sólo en presencia del EC y la dosis acumulada de cigarrillos fumados estaba relacionada con el título de los anticuerpos anti-CCP²⁶⁵. Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una asociación entre el hábito tabáquico y la presencia de los alelos del EC con anti-CCP positivos en pacientes con AR.

3.4 Fenotipos clínicos de la enfermedad

En base al modelo del EC citrulinado; la AR puede ser dividida en dos subgrupos distintos de entidad clínica de la enfermedad según la seropositividad para los anti-CCP: AR con anti-CCP positivos y AR con anti-CCP negativos. Cada uno de estos subgrupos parece tener una posible identidad genética distinta; mientras que los alelos HLA-DRB1 del EC y el gen PTPN22 estarían restringidos a la AR con anti-CCP positivos, otros genes como IRF-5 parecen conferir riesgo para la AR con anti-CCP negativos⁴⁸ (Figura 20).

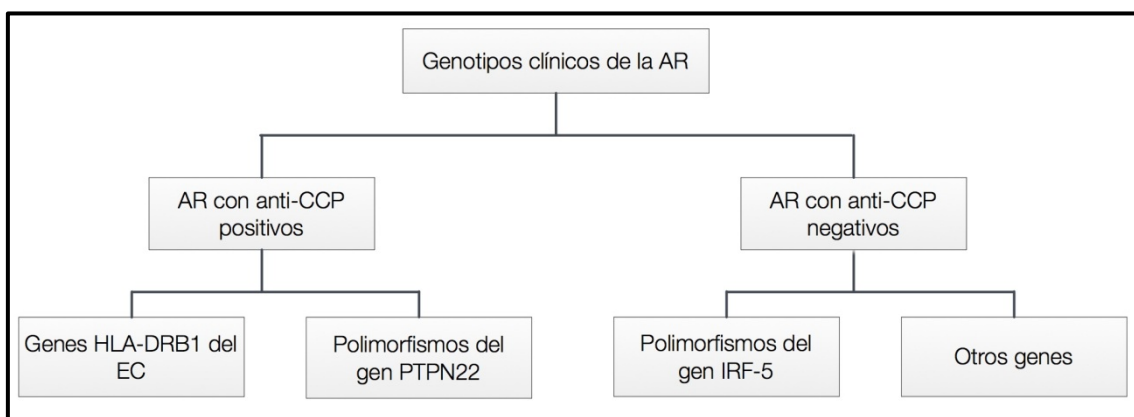


Figura 20. Clasificación de los fenotipos clínicos de la AR según la presencia de anti-CCP.

El gen IRF-5 se asocia con susceptibilidad a la AR y contribuye a la modulación del fenotipo erosivo de la enfermedad. Las variantes genéticas del gen IRF-5 contribuyen a una etiología y patogénesis única de la enfermedad asociada a pacientes con anti-CCP negativos. De hecho, la AR se debería considerar como dos entidades clínicas distintas; una con anti-CCP positivos y otra con anti-CCP negativos que presentarían distinta patogénesis molecular.

3.5 Periodontitis y citrulinización

Algunos de los agentes infecciosos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad en un contexto de predisposición genética y no de forma aislada, interactuando con otros factores de riesgo. Dentro de estos agentes destacamos la bacteria *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) que es la principal causante de la periodontitis. En numerosos estudios la enfermedad periodontal se ha asociado a AR y se ha sugerido una relación con la severidad de la misma^{243,267-273}.

P. gingivalis es la única bacteria conocida que expresa la enzima peptidil arginil desaminasa bacteriana (PPAD) que es responsable del proceso de citrulinización de proteínas produciendo una inflamación crónica y erosiva con destrucción del hueso periodontal. Además, *P. gingivalis* expresa otras proteinasas que pueden jugar un papel en este proceso²⁷⁴.



Figura 21. Enfermedad periodontal agresiva. En la imagen de la izquierda se observa las encías de un sujeto sano mientras que la imagen de la derecha corresponde a un paciente de 33 años con una enfermedad periodontal agresiva. En la imagen de este paciente se observa pérdida de masa ósea alrededor de los dientes y pérdida de los dientes frontales superiores. El paciente tiene un buen nivel de limpieza de dientes y sin otras patologías presentes. La enfermedad periodontal no refleja siempre una negligencia oral. La respuesta variable al biofilm de placa microbiana produce una variación individual marcada en la susceptibilidad a la enfermedad²⁷⁵.

Dos de los principales factores de riesgo asociado con la AR, el EC y el tabaco están asociados con la periodontitis y la infección por *P. gingivalis*. Los fumadores presentan un mayor riesgo de desarrollar periodontitis severa y pérdida de masa ósea en comparación con no fumadores²⁷⁶. El efecto del tabaco en el tejido periodontal depende del número de cigarrillos fumados al día y la duración del hábito²⁷⁷. *P. gingivalis* se encuentra en niveles significativamente mayores en el periodonto de fumadores comparado con no fumadores posiblemente como resultado del efecto deletéreo del tabaco sobre las capacidades inflamatorias del tejido periodontal. Además, los fumadores responden peor al tratamiento de la enfermedad periodontal^{275,278,279}. Es importante señalar que la relación existente entre AR y periodontitis es independiente del tabaquismo²⁷².

Los alelos HLA-DRB1 del EC se han asociado a la periodontitis. Katz y colaboradores reportaron una alta frecuencia de los alelos DR4 en individuos con periodontitis. Este alelo estuvo presente en el 80% de los pacientes con periodontitis rápidamente progresiva comparado con el 38% de controles sanos^{270,280,281}. La AR y la periodontitis presentan una fisiopatología similar caracterizada por una inflamación destructiva. La citrulinización de proteínas por la enzima PPAD de *P. gingivalis* y la posterior generación de autoanticuerpos que producirían una respuesta autoinmune en AR representa una posible unión entre esas dos patologías²⁸²⁻²⁸⁴ (Figura 22).

De esta manera, la citrulinización de proteínas y/o péptidos in vivo por parte de *P. gingivalis* nos llevaría a la hipótesis de que en sujetos genéticamente susceptibles (portadores de los alelos del EC) la presencia de estos péptidos y/o proteínas citrulinadas puede contribuir a la pérdida de tolerancia hacia antígenos citrulinados endógenos dando lugar a una producción de anti-CCP y contribuyendo al desarrollo de AR^{190,274}. En un estudio con sujetos afectados con AR y parientes sanos se documentó que los anticuerpos anti-*P. gingivalis* estaban asociados con los anticuerpos anti-CCP pero no con el FR²⁸⁵.

Así, junto al hábito tabáquico, el agente infeccioso *P. gingivalis* estaría asociado con AR con anti-CCP positivos en sujetos portadores del EC demostrándose que la periodontitis y en particular dicha bacteria se asocian con citrulinización y AR.

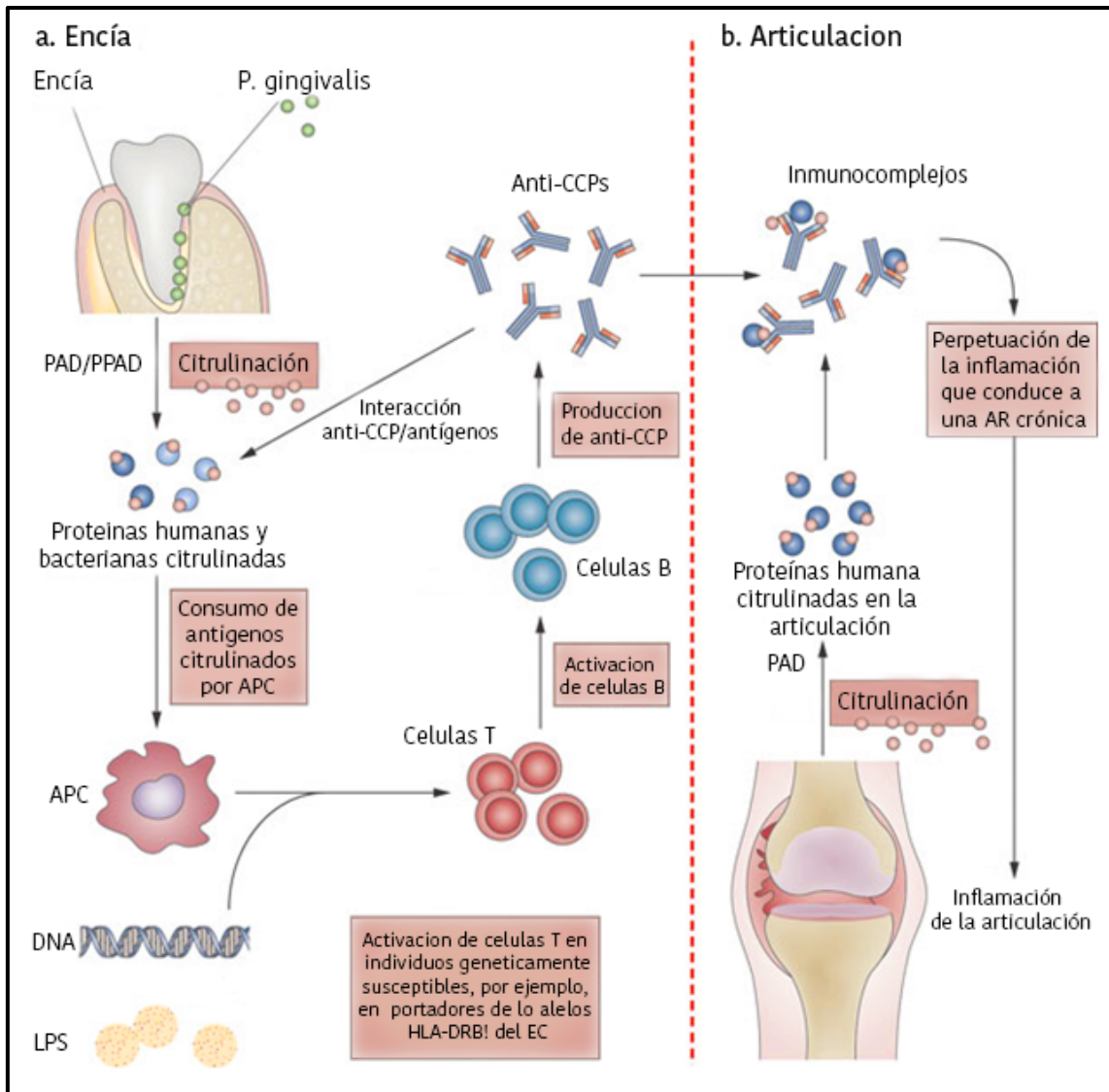


Figura 22. Hipótesis etiológica para *P. gingivalis* y citrulinización y su participación en la AR. a. **Cavidad Oral:** la infección por *P. gingivalis* conduce a una citrulinización de proteínas humanas y/o bacterianas tanto por PPAD (peptidilarginina deiminasa de *P. gingivalis*), PAD (peptidilarginina deiminasa humana) o ambas. Ante la presencia de señales de peligro como DNA y lipopolisacáridos bacterianos (LPS), las células T patogénicas son activadas por las células presentadoras de antígenos APCs (antígenos citrulinados en el contexto del EC HLA-DRB1). Estas células T median la activación de las células B patogénicas resultando en la producción de anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas citrulinadas (anti-CCP). b. **Articulaciones:** un segundo evento inflamatorio ocurre en las articulaciones conduciendo a la citrulinización de proteínas de la articulación por la enzima PAD (peptidilarginina deiminasa humana) y la producción de inmunocomplejos en la articulación. El resultado es la perpetuación de un proceso inflamatorio que causaría AR crónica. Tomado y traducido de Lundberg y cols²⁸².

Una de las razones por la que la AR es considerada una enfermedad de naturaleza autoinmune es la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes. Se han descrito diversos autoanticuerpos en la enfermedad:

- Anticuerpos dirigidos contra antígenos de los cartílagos como el colágeno de tipo II^{286,287} y la glicoproteína-39 del cartílago humano²⁸⁸.
- Anticuerpos dirigidos contra enzimas de la ruta glicolítica como la glucosa-6-fosfato isomerasa²⁸⁹ y la creatinina quinasa²⁹⁰.
- Anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas como el FR.
- Anticuerpos dirigidos contra proteínas y/o péptidos citrulinados como la filagrina, el fibrinógeno y la vimentina^{291,292}.
- Anticuerpos antinucleares (ANAs)
- Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)

Sin embargo, sólo algunos de estos anticuerpos son específicos de la enfermedad. Entre los que encontramos el FR y los anticuerpos que van dirigidos contra proteínas y/o péptidos citrulinados.

4.1 Factor Reumatoide

Desde la inclusión del FR en los criterios de clasificación de la ACR de 1987, su determinación en suero ha sido una de las más habituales en los pacientes con AR. Inicialmente descritos por Waaler y Rose en 1940, estos anticuerpos reactivos van dirigidos contra la porción C terminal del fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG y son producidos por las células B de la sinovial. Aunque el isotipo más común es IgM, también se ha descrito la presencia de anticuerpos IgG e IgA (Figura 23). Estos anticuerpos aparecen en el 60-80% de pacientes con AR aunque no son específicos de esta enfermedad²⁹³⁻²⁹⁵.

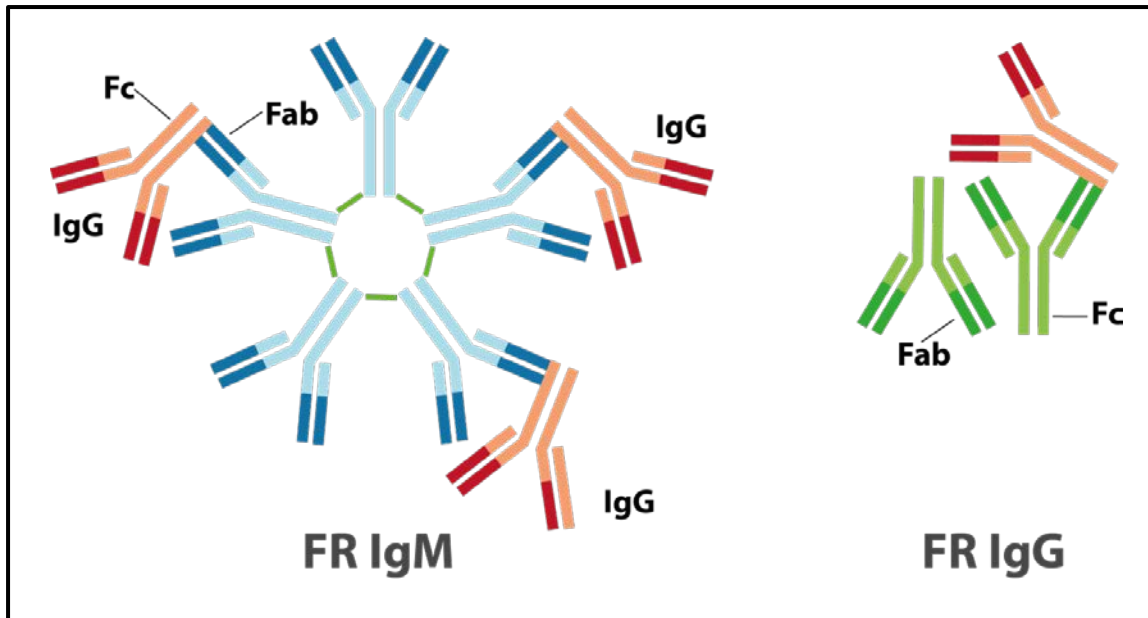


Figura 23. Isotipos de Factor Reumatoide. El FR son anticuerpos que van dirigidos contra la porción Fc de la molécula de IgG. Estos anticuerpos son principalmente de isotipo IgM pero también existen de clase IgG e IgA. Fuente de la imagen: Autor (2015).

Hoy en día, el origen de la síntesis de FR no se conoce en su totalidad. Una respuesta inmune anormal parece seleccionar, vía estimulación antigénica, FR de alta afinidad del repertorio natural de anticuerpos del individuo²³⁶. Este hecho puede acontecer en enfermedades reumáticas y en algunas enfermedades inflamatorias caracterizadas por exposición crónica a un antígeno. Además, el desarrollo de FR tras algunas infecciones sugiere que representan una respuesta hacia los anticuerpos que han reaccionado con los microorganismos²⁹⁶.

De la misma manera, el papel biológico que desempeña el FR no está definido de forma clara en la actualidad. Las posibles funciones incluyen la unión y procesamiento a antígenos presentes en inmunocomplejos, presentación de antígenos a células T en el contexto de las moléculas HLA, amplificación de la respuesta humoral frente a infecciones por bacterias o parásitos y el aclaramiento de inmunocomplejos. La producción del FR en la sinovial, la formación de complejos inmunes-FR que fijan complemento y el reclutamiento y activación de células T, células B y macrófagos contribuyen a la inflamación y daño articular en la AR²⁹⁷.

4.1.1 Prevalencia del factor reumatoide

El FR positivo se puede presentar tanto en pacientes con enfermedades reumáticas, como en aquellos con enfermedades no reumáticas e incluso en sujetos sanos²⁹⁸. Dentro de las enfermedades reumáticas encontramos un grupo que comparten características clínicas similares como poliartritis simétrica y síntomas

constitucionales. En este grupo incluimos a la AR, el SS, el LES, la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), la crioglobulinemia mixta (tipos II y III) y la polimiositis y dermatomiositis (Tabla 6).

Enfermedad	FR positivos (%)
Artritis	
Artritis reumatoide	60-80
Artritis idiopática juvenil	15
Artritis psoriásica	<15
Enfermedades autoinmunes sistémicas	
Síndrome de Sjögren primario	70
Lupus eritematoso sistémico	30
Enfermedad mixta del tejido conectivo	25
Polimiositis/Dermatomiositis	20
Esclerosis Sistémica	20
Infecciones bacterianas	
Endocarditis bacteriana subaguda	40
Tuberculosis	15
Sífilis	8-37
Infecciones víricas	
Hepatitis infecciosa A, B, C	25
EBV y CMV	20
Coxsackie B	15
Herpesvirus	10-15
Dengue	10
VIH	10-20
Sarampión	8-15
Parvovirus	10
Rubeola	15
Infecciones por parásitos	
Enfermedad de Chagas	15-25
Malaria	15-18
Oncocercosis	10
Toxoplasmosis	10-12
Otras enfermedades	
Crioglobulinemia	70
Cirrosis hepática	25
Macroglobulinemia de Waldenström	30
Enfermedad pulmonar intersticial	25

Tabla 6. Prevalencia del factor reumatoide en enfermedades reumáticas y no reumáticas. Las principales entidades clínicas que se asocian a una alta prevalencia de FR son el SS y las crioglobulinemias mixtas de tipo II y III con frecuencia también asociadas al virus de hepatitis C. Mientras que los pacientes con AR y la mayoría de pacientes con SS presentan elevaciones sostenidas del FR policlonal; los pacientes con enfermedad linfoproliferativa y crioglobulinemia mixta de tipo II, así como un pequeño porcentaje de pacientes con SS pueden tener FR monoclonal circulando en sangre.

Para la AR, aunque el FR presenta una sensibilidad razonable entre el 60-80%, su especificidad es baja (70-80%)^{299,300}. La sensibilidad del FR puede llegar a ser hasta del 90% pero eso depende tanto del método empleado para determinar el FR como de la severidad y duración de la enfermedad de los pacientes en los distintos estudios realizados. Los isotipos IgG e IgA se encuentran ocasionalmente en pacientes con AR en ausencia de FR IgM^{301,302}. Sin embargo, estos isotipos pueden presentar valor pronóstico ya que se asocian a una enfermedad más severa^{303,304}.

En las patologías no reumáticas caracterizadas por una estimulación antigénica crónica se induce normalmente la producción de FR. Entre ellas destacamos las enfermedades infecciosas, enfermedades pulmonares intersticiales y algunas neoplasias de células B como principales dentro de este grupo (Tabla 6). Pero no sólo en las enfermedades reumáticas y no reumáticas encontramos el FR positivo, sino además en un bajo porcentaje de individuos sanos, especialmente en personas mayores. En sujetos jóvenes sanos, la frecuencia es del 4% mientras que en personas mayores sin enfermedades reumáticas aumenta hasta un 25%^{305,306}.

El FR está incluido dentro de los criterios de clasificación para la AR de la ACR (1987) aunque no es imprescindible para el diagnóstico de la enfermedad⁷. Los pacientes que expresan el FR denominados antiguamente como “seropositivos” presentan un curso más agresivo de la enfermedad que aquellos pacientes en los que no se expresa y que se conocen como “seronegativos”^{299,307}.

El hábito tabáquico, un factor de riesgo para el desarrollo de una AR más severa, se asocia con una prevalencia incrementada de FR. En un estudio de casos y controles, Padyukov y colaboradores encontraron que el riesgo de desarrollar AR con FR positivo asociado al EC estaba fuertemente influenciado por la presencia del consumo de tabaco. En dicho estudio; el tabaco, los genes del EC y la combinación de esos dos factores no incrementaron el riesgo de desarrollar AR con FR negativo²³⁵.

4.1.2 Utilidad clínica del factor reumatoide

En la AR, la evidencia de fenómenos autoinmunes precede a menudo la clínica de la enfermedad. El FR se ha encontrado hasta casi 30 años antes del diagnóstico clínico de la enfermedad y sujetos con títulos elevados de FR son más propensos al desarrollo de AR en un futuro³⁰⁸⁻³¹⁰. Sin embargo, el valor diagnóstico del FR es

limitado. El 30% de los pacientes con AR tienen el FR negativo, aunque este porcentaje puede ser superior al 50% en las fases tempranas de la enfermedad³¹¹.

La presencia de FR y anti-CCP positivos en sujetos aparentemente sanos incrementa la probabilidad de tener AR con un riesgo relativo aproximado del 70% para ambos anticuerpos simultáneos (312). Sin embargo, la mayoría de personas asintomáticas con un FR positivo no progresan a AR o LES. Por ello, la medida del FR se puede considerar un test de screening pobre para enfermedades reumáticas futuras³⁰⁹. El FR puede tener algún valor pronóstico respecto a las manifestaciones clínicas y actividad de la enfermedad como la severidad de las erosiones articulares. La AR con FR positivo se encuentra frecuentemente asociada a una enfermedad articular más agresiva y a menudo complicada con presencia de manifestaciones extraarticulares en comparación con la AR con FR negativo. Como ejemplos destacamos:

- Los nódulos reumatoides y la vasculitis ocurren casi exclusivamente en los pacientes con FR positivo³¹³⁻³¹⁵. Esos hallazgos se encuentran asociados con una mortalidad incrementada³¹⁶.
- La progresión radiográfica puede presentar una evolución más rápida en aquellos pacientes que presentan un FR positivo en la evaluación inicial^{23,317,318}.
- En un estudio retrospectivo de casos-controles de 135 mujeres con AR precoz se encontró que aquellas pacientes con un FR positivo persistente tenían más erosiones, nódulos, enfermedad extraarticular, discapacidad funcional y actividad de la enfermedad que los individuos con FR negativo o intermitente sobre un periodo de seguimiento de seis años³¹⁹.
- Los títulos altos de FR tienden a correlacionarse con enfermedad severa y persistente, presencia de nódulos reumatoides y manifestaciones extraarticulares²⁹⁷.

4.2 Anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados

Durante las tres últimas décadas se han descrito distintos autoanticuerpos que reconocen determinantes antigénicos que contienen péptidos y/o proteínas que han sido modificados mediante citrulinización. Estos anticuerpos incluyen los anticuerpos

anti-factor perinuclear (AFP), anti-queratina (AKA), anti-filagrina (AFA), anti-vimentina citrulinada (anti-Sa) y anti-péptido citrulinado cíclico (anti-CCP)²³⁹.

La caracterización de autoantígenos que contienen como epítipo el aminoácido no estándar citrulina, se ha convertido en uno de los más importantes descubrimientos en el estudio de pacientes con AR. Como se ha visto anteriormente, la citrulina resulta de la modificación post-transcripcional por desaminación de residuos de arginina presentes en péptidos y proteínas humanas por acción de la enzima PAD²³⁹. Los anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados constituyen una gran familia de anticuerpos que aportan una buena sensibilidad y una especificidad excelente. Estos anticuerpos se han empleado en el diagnóstico de la AR desde el descubrimiento de los AFP hace aproximadamente 50 años y más tarde de los AKA.

4.2.1 Anticuerpos anti-factor perinuclear (AFP)

Estos anticuerpos fueron descritos por primera vez en pacientes con AR en el año 1964 por Mandema y Nienhuis. Se detectaban mediante inmunofluorescencia indirecta usando epitelio bucal como sustrato (Figura 24) y presentaban una especificidad para la AR entre el 73 y 99% con una sensibilidad menor, del 49 al 87%³²⁰⁻³²².

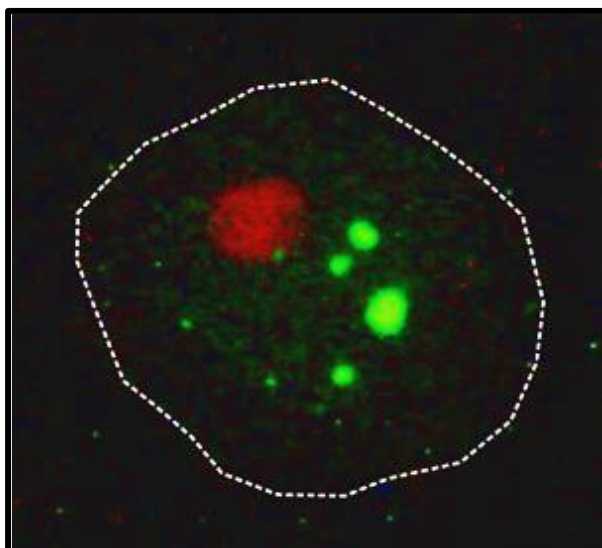


Figura 24. Detección de anticuerpos anti-factor perinuclear mediante IFI. Patrón de tinción característico por IFI en células de mucosa bucal de un suero de un paciente con AR y AFP positivos. Los bordes de la célula de la mucosa bucal están marcados por una línea discontinua. El núcleo de la célula está teñido en rojo mientras que los gránulos de queratohialina están teñidos por los anticuerpos del paciente vía anticuerpo IgG marcado con un marcador fluorescente. Tomado de van Venrooij y colaboradores³²³.

Westgeest y colaboradores encontraron que el título de los AFP se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Entre los pacientes con FR positivo identificó a pacientes con peor pronóstico y esa asociación con la gravedad de la enfermedad fue más clara en el grupo de pacientes con FR negativo³²⁴.

4.2.2 Anticuerpos anti-queratina (AKA)

Los AKA se identificaron en 1979 en pacientes con AR mediante IFI sobre sustrato de esófago de rata (Figura 25). Se observó un patrón característico de líneas paralelas en la capa córnea del esófago³²⁵. Presentaban una sensibilidad de entre el 40 al 60% con una especificidad del 88 al 99%³²⁶. Mediante un ensayo de Western blot o inmunoblot para la detección de AKA empleando tres antígenos proteicos extraídos del epitelio de esófago de rata se encontró que tenían una sensibilidad del 43 al 50% con una especificidad del 99% para AR³²⁷.

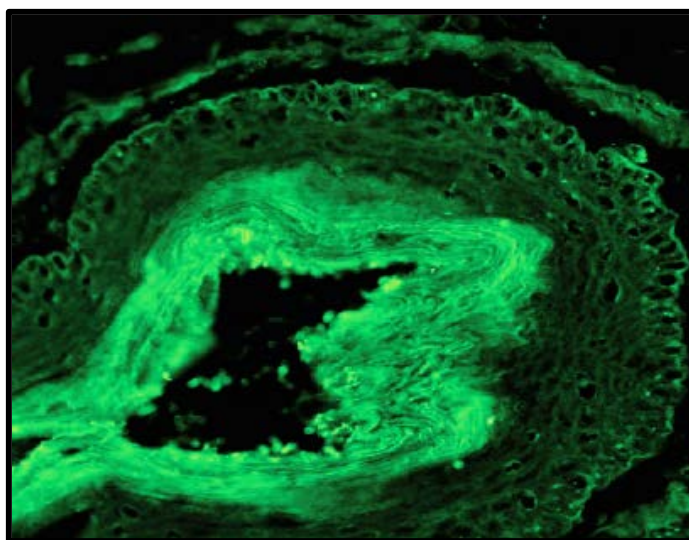


Figura 25. Detección de anticuerpos anti-queratina mediante IFI. Imagen característica por IFI de AKA formado por un patrón lineal de tinción definido por una fluorescencia laminada del estrato corneo en el tercio medio de tejido de esófago de rata. La fluorescencia homogénea afecta al estrato corneo mientras que la fluorescencia del estrato basal o del estrato espinoso debería ser excluida ya que estos dos últimos patrones no son específicos de AR. Tomado de A.R. Bradwell et al., Atlas of tissue autoantibodies (2008)³⁸⁰.

Sin embargo, aunque los AKA presentaban una elevada especificidad para la AR; estos anticuerpos y los AFP nunca fueron empleados ampliamente debidos tanto a la variabilidad en la interpretación y la valoración de las imágenes por IFI como a la dificultad de estandarización de los sustratos.

4.2.3 Anticuerpos anti-filagrina (AFA)

El estudio de los AFP y AKA conllevó a la apreciación de que ambos tipos de anticuerpos reconocían la filagrina como antígeno diana. La filagrina es una proteína filamentosa implicada en la organización de estructuras del citoesqueleto en las células epiteliales. Así, se introdujo el término AFA para designar a estos anticuerpos asociados con la AR^{328,329}. Pero esta especificidad compartida está directamente relacionada con la citrulinización de las proteínas diana, es decir, la presencia de residuos de citrulina es esencial para que la filagrina fuera reconocida por los AFA. La filagrina deriva de la profilagrina por rotura proteolítica y posterior citrulinización de residuos de arginina. Girbal-Neuhauer y cols. demostraron que los epítomos de filagrina contienen residuos de citrulina^{291,330}.

Se han desarrollado ensayos por inmunoblot y por ELISA que emplean filagrina purificada de piel humana para la detección de AFA. La sensibilidad en la mayoría de los casos oscila entre el 40 y 50% pero puede variar de forma considerable probablemente por diferencias en el grado de citrulinización(331-334). Sin embargo, presentan una alta especificidad para la AR (>90%) comprendida entre el 95 y 99%³³¹⁻³³⁵. Vincent y cols. detectaron AFA por inmunoblot en el 41% de pacientes con AR con una especificidad del 99%. Cuando se combinaba la determinación de AFA con la de AKA se logró una mayor sensibilidad (64%) sin pérdida de especificidad³³¹. Se ha encontrado que la determinación de AFA por ELISA es algo más sensible (47-54%) que el ensayo por inmunoblot^{336,337}. La diferencia en los resultados para los ensayos AFA, AKA y AFP y la influencia de la preparación del antígeno implica que varios epítomos son reconocidos.

La sensibilidad de los ensayos AFA parece ser dependiente del método de purificación de la filagrina. Así, es muy difícil conseguir cantidades suficientes de filagrina purificada recombinante y más aún, con una cantidad reproducible de residuos de citrulina. Todo ello dificulta la estandarización del ensayo. La identificación de epítomos citrulinados en los AFA condujo al desarrollo de ensayos que emplean péptidos citrulinados como antígenos diana. De esta manera, los problemas asociados a los AFA no se presentarían cuando se emplean dichos péptidos citrulinados como antígeno. Así, los ensayos que emplean péptidos citrulinados se han desarrollado desde entonces y como alternativa a los anticuerpos APF, AKA y AFA^{338,339}.

4.2.4 Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico (anti-CCP)

En el año 1998, Schellekens y cols. presentaron una nueva técnica para detectar los anticuerpos antifilagrina citrulinada. Consistían en péptidos lineales citrulinados y se investigaron nueve péptidos citrulinados diferentes. Las sensibilidades clínicas para la AR oscilaban entre el 27 y 65% con especificidades clínicas entre el 97 y 99%³³⁸.

Para aumentar la sensibilidad del ensayo, Schellekens y cols. introdujeron en el año 2000 un péptido citrulinado cíclico CCP1 derivado de la secuencia de filagrina como antígeno en la prueba de ELISA. Estos péptidos presentaban una estructura en anillo debido a la existencia un puente disulfuro intramolecular y donde los epítomos de citrulina estaban expuestos de forma óptima para ser reconocidos por los anticuerpos. Este CCP1 fue empleado como sustrato antigénico para la primera generación de anti-CCP denominados anti-CCP1 (Figura 26). Con estos CCP1, la técnica ELISA aumentó considerablemente su sensibilidad hasta el 68% mientras que la especificidad se elevó hasta el 98%, muy próximo al 100%³³⁹.



Figura 26. Péptido citrulinado cíclico de primera generación (CCP1)³³⁹. Secuencia de aminoácidos que constituyen el CCP1. La X corresponde al aminoácido no esencial citrulina. Las dos C corresponden a dos cisteínas que se encuentran unidas mediante un puente disulfuro establecido entre sus átomos de azufre confiriendo una estructura cíclica.

Aunque la sensibilidad de los anti-CCP1 era superior a los anticuerpos clásicos AKA, AFP y mayoría de ensayos AFA, no llegaba a alcanzar la sensibilidad del FR IgM. El péptido empleado en el ensayo anti-CCP1 derivaba de secuencias de filagrina, pero la filagrina no se expresa en la sinovial y lo más probable es que no sea el antígeno natural de los anti-CCP1³³⁵. De este modo, otros péptidos podrían potencialmente proporcionar mejores epítomos para la detección de estos anticuerpos. Tras la aparición de este primer ensayo con estructura cíclica del antígeno citrulinado, se han ido desarrollando nuevas generaciones de anticuerpos anti-CCP (anti-CCP2 y

anti-CCP3) así como ensayos para otros antígenos diana como la vimentina citrulinada (anticuerpos anti-Sa y anti-MCV).

Para el desarrollo de la segunda generación de anti-CCP, se estudiaron varias librerías de péptidos conteniendo citrulina frente a sueros de pacientes con AR y se obtuvieron péptidos noveles que se incorporaron en una segunda generación de anti-CCP denominados anti-CCP2. Los péptidos citrulinados cíclicos en el ensayo-CCP2 no presentaban homología con la filagrina u otra proteína conocida. Esta segunda generación de ensayos anti-CCP2 fue desarrollada para capturar los determinantes antigénicos detectados por los anticuerpos APF, AKA, AFA, anti-Sa y anti-CCP1³⁴⁰. Con estos anti-CCP2 se consiguió una mayor sensibilidad frente a los anti-CCP1 sin pérdida de especificidad. La sensibilidad aumentó del 68% al 82% en el diagnóstico de la AR mientras que la especificidad fue superior al 98%. La sensibilidad fue comparable al FR que tenía una sensibilidad del 80%³⁴¹. Por último, los anticuerpos de tercera generación o anti-CCP3 presentaban una sensibilidad del 4.3% superior a los anti-CCP2 en AR sin pérdida de especificidad³⁴². El ensayo anti-CCP3 que detecta anticuerpos de tipo IgG ha sido modificado posteriormente para la detección tanto de anticuerpos de tipo IgG como IgA denominándose este nuevo ensayo anti-CCP3.1.

El desarrollo y caracterización de autoantígenos citrulinados cíclicos en los ensayos anti-CCP se puede considerar como uno de los más importantes descubrimientos serológicos en Reumatología en los últimos quince años. Estos anticuerpos cambiaron el panorama del diagnóstico de la AR debido a la buena sensibilidad y excelente especificidad de los resultados. En la actualidad el ensayo anti-CCP2 permanece como el "gold estándar" y es el más empleado para la cuantificación de anti-CCP en suero. El ensayo anti-CCP2 por ELISA se encuentra comercialmente disponible a través de varias compañías y todos presentan el mismo péptido CCP2 al estar patentado para su comercialización. Aunque todos estos ensayos emplean el mismo péptido, se observan pequeñas diferencias en su perfil diagnóstico³⁰⁵. Eso es debido a que aunque el antígeno empleado es el mismo; el material del soporte sólido puede diferir y las variables del ensayo empleado (buffer, conjugado, tiempo de incubación) también pueden ser distintas y contribuyen a las pequeñas diferencias observadas.

Aunque el término anti-CCP se emplea para referirnos a los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico en general; el uso de los términos anti-CCP1, anti-CCP2 y anti-CCP3 se emplean para designar el tipo de ensayo específico que se ha empleado

a la hora de determinar los anti-CCP. Sin embargo, en la actualidad, el término ACPA ha ido reemplazando al de anti-CCP a la hora de designar estos anticuerpos. Este término es un concepto más general que no sólo englobaría a los anti-CCP sino otras especificidades dirigidas contra otros péptidos y proteínas citrulinados.

4.2.5 Utilidad clínica de los anti-CCP

Un marcador serológico ideal se debe caracterizar por presentar una alta sensibilidad y especificidad para la enfermedad en cuestión así como ser detectable en las etapas iniciales o precoces de dicha enfermedad. Por último y no menos importante, debe ser capaz de pronosticar la evolución de la enfermedad.

1) Diagnóstico de AR

Como se ha enunciado, uno de los más importantes requisitos que ha de cumplir un marcador serológico es que debe ser específico para la enfermedad y presentarse en un alto porcentaje de pacientes. Varios estudios basados en ensayos con CCP1 y CCP2 han mostrado que son muy específicos para la AR presentando una excelente especificidad (90-100%) con una buena sensibilidad (41-88%) (Tabla 7).

Anti-CCP			FR IgM		Referencias
Generación de péptidos	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	
CCP1	68	96	-	-	Schellekens y cols. ³³⁹
CCP1	41	98	62	84	Bizarro y cols. ³⁴³
CCP1	43	98	50	93	Jansen y cols. ³⁴⁴
CCP1	56	90	73	82	Bas y cols. ³⁴⁵
CCP1	88	89	70	82	Suzuki y cols. ³⁴⁶
CCP1	47	97	-	-	Zeng y cols. ³⁴⁷
CCP2	82	98	80	88	Van Venrooij y cols. ³⁴¹
CCP2	66	90	72	80	Lee y cols. ³⁴⁸
CCP2	80	99	-	-	Van Venrooij y cols. ³⁴⁹
CCP2	71	95	91	31	Girelli y cols. ³⁵⁰

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de los anti-CCP y del FR IgM. La especificidad de los ensayos de anticuerpos anti-CCP es en todos los casos notablemente más alta que para la determinación del FR. La sensibilidad oscila entre el 41 y el 88% siendo parecida a la del FR. Las diferencias entre los resultados de los distintos estudios se debe en parte a las características de las poblaciones elegidas: pacientes con AR frente a pacientes con otras enfermedades reumáticas, enfermedades infecciosas y/o controles sanos.

Cuando se analizan las curvas ROC de eficacia diagnóstica; el área bajo la curva era mayor para los anti-CCP que para otras determinaciones como el FR y los AFA³⁴⁶. Al presentar los anti-CCP una especificidad bastante superior lo convierten en un marcador ideal para la AR en vez del FR. De hecho, el 40% de los pacientes con FR negativo y síntomas clínicos de AR presentan los anti-CCP positivos. Por consiguiente, el uso combinado del FR con los anti-CCP mejoraría la precisión diagnóstica en la enfermedad.

Prujin y cols. reunieron datos de 154 estudios para evaluar el rendimiento estadístico del ensayo anti-CCP2. En dicha evaluación aproximadamente el 75% de los pacientes con una AR establecida y el 61% de pacientes con una AR de inicio reciente presentaron los anti-CCP2 positivos³⁵¹ (Tabla 8).

Grupo de pacientes	N	Anti-CCP2 positivo	S (%)	E (%)
Artritis Reumatoide	17.359	12.431	72	
De inicio	4.397	2.677	61	
Establecida	12.980	9.754	75	
Controles	20.222	960	5	95
No AR	15.461	911	6	94
Sanos	7.761	49	1	99

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad del ensayo CCP2³⁵¹. Sensibilidad y especificidad acumulada del ensayo CCP2 obtenida tras agrupar 154 estudios independientes publicados entre 2002 y 2009.

2) Diferenciar la AR de otras patologías

Varias patologías pueden ser confundidas con la AR en sus etapas iniciales. En varios estudios se pone de manifiesto que los anti-CCP ayudan a los clínicos a distinguir la AR de enfermedades que pueden ser confundidas con la AR, sobre todo en aquellos casos donde el FR no es discriminante. Aunque los anti-CCP son altamente específicos para la AR, se han encontrado en un 5-13% de pacientes con PSA y en un menor porcentaje de pacientes con SS primario^{352,353}.

La presencia de anti-CCP se ha reportado en pacientes con LES y SS primario. Normalmente la presencia de estos anticuerpos se ha asociado con artritis erosiva o deformante³⁵⁴⁻³⁵⁹. Por ejemplo, en un estudio, el 17% de una cohorte de 335 pacientes con LES eran anti-CCP positivos mientras que en otro estudio el 10% de 155 pacientes con SS primario eran anti-CCP positivos^{355,359}. Sin embargo, en tales casos algunos expertos sugieren que esos pacientes deberían ser reclasificados como síndromes de solapamiento LES-AR (también conocido como “*rhus*”) y SS primario-AR respectivamente³⁵⁸.

La AR y el LES pueden ser difíciles de distinguir en las primeras etapas. Pacientes con LES de inicio reciente pueden ser diagnosticados por error como AR porque tienen FR positivo y presentan poliartritis erosiva. Mediwake y cols. estudiaron una cohorte de pacientes con LES donde demostraron que los anti-CCP podían discriminar entre AR y LES con FR positivo. Sin embargo, los anticuerpos anti-RA33 y el FR no fueron útiles para realizar dicha discriminación³⁶⁰.

Hallazgos similares se han reportado en pacientes con PSA. En un estudio realizado en una cohorte de pacientes con PSA, los anti-CCP fueron positivos en una pequeña proporción de pacientes con PSA que presentaban artritis erosiva y participación de múltiples articulaciones³⁶¹. Los anti-CCP pueden ser una herramienta útil a la hora de diferenciar PSA de AR, especialmente en las formas de PSA denominadas “*AR-like*” que no presentan elementos pertenecientes a espondiloartropatías³⁶².

Algunos pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) presentan manifestaciones extrahepáticas como artropatía la cual es común en el 20% de dichos pacientes. La artritis que presentan estos pacientes es similar a la que acontece en la AR y consiste en una poliartritis inflamatoria simétrica que implica a las articulaciones pequeñas. Con menor frecuencia se presenta como una mono u oligoartritis de articulaciones grandes^{363,364}. Como el FR positivo es común en muchos pacientes infectados por el VHC sobre todo en aquellos con crioglobulinemia mixta, el FR no se puede emplear para distinguir la infección por VHC de la AR^{365,366}.

En contraste al FR, los anti-CCP raramente se presentan en el suero de pacientes infectados por VHC. En un estudio de 50 pacientes con VHC sin crioglobulinemia, ninguno de ellos fue positivo para los anti-CCP2 (44% fueron positivos para FR) mientras que en 29 pacientes con VHC y crioglobulinemia sólo

fueron positivos los anti-CCP2 en dos pacientes (76% fueron positivos para FR). Esos dos pacientes presentaban valores de anti-CCP2 en el límite de positividad y se definieron como falsos positivos por uniones no específicas en el ensayo ELISA³⁶⁷. En la Tabla 9 se muestra la prevalencia de los anti-CCP2 en presencia de otras enfermedades reumáticas y no reumáticas obtenidas de tres revisiones sistémicas³⁶⁸⁻³⁷⁰.

Enfermedad	Aggarwal y cols. (2009)		Bizarro y cols. (2007)		Avouac y cols. (2006)	
	N	Positivos (%)	N	Positivos (%)	N	Positivos (%)
Artritis psoriásica	1343	9	1003	7	424	8
Lupus eritematoso sistémico	1078	8	1448	4	567	9
Síndrome de Sjögren	609	6	915	3	521	5
Espondiloartropatías	431	2	459	3	181	3
Esclerodermia	380	7	342	4	-	-
Artritis idiopática juvenil	169	8	519	5	-	-
Vasculitis	107	5	245	2	67	1
Polimiositis Dermatomiositis	75	0	201	0	-	-
Polimialgia reumática	146	0	252	6	49	0
Osteoartritis	182	2	387	3	-	-
Fibromialgia	74	3	10	0	-	-
Enfermedad tiroidea autoinmune	-	-	93	1	-	-
Enfermedad mixta del tejido conectivo	-	-	94	2	-	-
Síndrome antifosfolípido	-	-	11	0	-	-
Hepatitis C	258	3	588	1	219	3
Cáncer	-	-	52	0	-	-
Sujetos sanos	-	-	4905	0	1561	0

Tabla 9. Prevalencia de los anti-CCP en presencia de otras enfermedades reumáticas y no reumáticas³⁶⁸⁻³⁷⁰. Prevalencia de la determinación de anti-CCP obtenido en tres estudios diferentes. Los resultados muestran una elevada especificidad de la prueba.

3) Diagnóstico de AR precoz o de inicio reciente

Las estrategias terapéuticas actuales se basan en un tratamiento precoz de los pacientes ya que la mayor parte del daño articular acontece en los dos primeros años para el 90% de los pacientes. Así, el diagnóstico precoz de la enfermedad es crucial.

Los criterios de clasificación para la AR de la ACR (1987) difícilmente se cumplen en los primeros meses de la enfermedad. En algunos casos, los síntomas de la enfermedad son leves e inespecíficos y los pacientes no cumplen dichos criterios. Por lo tanto, es necesaria la detección de un anticuerpo específico de la enfermedad.

Los anti-CCP pueden preceder a la aparición de la AR durante varios años. Rantapaa-Dahlqvist y cols. analizaron la sangre de 83 donantes que con posterioridad desarrollaron AR. Los anti-CCP2 se detectaron en el 25% de los sujetos en un periodo de 1,5 a 9 años antes del comienzo de los primeros síntomas de la enfermedad. En el año y medio anterior a la presentación de los primeros síntomas, la sensibilidad de los anti-CCP2 se incrementó hasta el 52%. Más del 70% de los pacientes fueron anti-CCP2 positivos en su primera visita al clínico. El FR también se detectaba en el suero de los controles pero con una menor sensibilidad. Concluyeron que los anti-CCP2 tenían la mayor capacidad para predecir el futuro desarrollo de AR³⁷¹.

Los anti-CCP se detectan aproximadamente en el 50-60% de pacientes con AR temprana, normalmente después de 3-6 meses de síntomas con una especificidad comprendida entre el 95 y el 98%. En un estudio realizado por Van Gaalen y cols. evaluaron a 936 pacientes con artritis de inicio reciente, donde 318 (34%) de ellos fueron clasificados como AI. Usando los anticuerpos anti-CCP2 se observó progresión desde AI hasta AR en el 93% de los pacientes con anti-CCP positivo y sólo en el 25% de los pacientes con anti-CCP negativo a los tres años de seguimiento. Tras el análisis multivariante se identificó que la poliartritis, artritis simétrica, presencia de erosiones en radiografías y anticuerpos anti-CCP eran factores pronósticos de AR. Este estudio puso de manifiesto que los anti-CCP en pacientes con AI indican una alta probabilidad de progresar a AR³⁷².

La medida de los anti-CCP es útil en el diagnóstico diferencial de poliartritis temprana debido a la alta especificidad para la AR que presentan dichos anticuerpos. En una revisión sistémica por Avouac y cols. concluyeron que los anti-CCP2 eran altamente predictores de un futuro desarrollo de AR tanto en sujetos sanos como en pacientes con AI³⁷³. El uso combinado de títulos altos de anti-CCP (≥ 100 U/ml) junto a un FR positivo mejora la especificidad en el diagnóstico de la AR^{374,375}. Sin embargo, en los pacientes con AR y reumatismo palindrómico, los anticuerpos anti-CCP estuvieron presentes en el 55% de ambas condiciones lo que indicó que el reumatismo palindrómico estaba estrechamente relacionado y a menudo progresa a AR³⁷⁶.

Los nuevos criterios de clasificación de AR de la ACR/EULAR (2010) que se emplean en pacientes con AR temprana han incluido a los anti-CCP junto con el FR como marcadores serológicos de diagnóstico y clasifican según los títulos a los casos más graves de la enfermedad¹⁷. Recientemente Infantino y cols. indicaron que la mejor combinación para el screening de AR temprana era el empleo de anti-CCP junto con el FR IgM e IgA³⁷⁷.

4) Pronóstico de la AR y predicción de enfermedad severa

Varios estudios ponen de manifiesto que la presencia de anti-CCP positivos en pacientes con AR temprana desarrollan una enfermedad más erosiva y por lo tanto más agresiva que en aquellos pacientes donde éstos son negativos. Kroot y cols. determinaron los anti-CCP en la visita inicial en 273 pacientes y evaluaron el daño radiológico articular mediante el índice de Larsen. A los seis años de seguimiento encontraron que los pacientes con anti-CCP positivos habían desarrollado un daño radiológico más severo³⁸. En otros estudios se ha confirmado la superioridad de los anti-CCP frente al FR IgM a la hora de predecir enfermedad erosiva. Los anti-CCP son un predictor independiente de daño radiológico y progresión³⁷⁸.

Sin embargo, en otros estudios se demuestran que la combinación de los anticuerpos anti-CCP junto con el FR IgM aumenta la capacidad de predecir una enfermedad erosiva y progresiva^{37,307,379}. Visser y cols. desarrollaron un modelo pronóstico (Tabla 10) que predice tres formas de desenlace en pacientes con artritis precoz: autolimitada, persistente no erosiva y persistente erosiva. El modelo comprende siete variables muy similares a las incluidas en los criterios ACR (1987) junto a la inclusión novedosa de los anti-CCP2.

Estos valores predictivos constituyen una base valiosa a la hora de tomar decisiones terapéuticas en una fase temprana de la artritis. El reconocimiento temprano de una artritis persistente erosiva permitirá una intervención temprana con FARMES y un mejor control de la enfermedad, con el consiguiente beneficio en el pronóstico de los enfermos³⁸¹.

Criterios	Definición
1	Duración de los síntomas en la visita inicial
2	Rigidez matutina \geq 1 hora
3	Artritis \geq 3 grupos articulares
4	Dolor en la compresión bilateral de articulaciones metatarsofalángicas
5	FR IgM positivo ($>$ 5 UI)
6	Anti-CCP2 positivos ($>$ 92 UI)
7	Presencia de erosiones en radiografías de manos y pies

Tabla 10. Variables del modelo predictivo de una artritis persistente erosiva³⁸¹. La aplicación del modelo en 524 pacientes consecutivos con artritis precoz tras dos años de seguimiento dio lugar a tres valores predictivos clínicamente relevantes para cada paciente: uno para la artritis de evolución limitada, otro para la artritis persistente no erosiva y otro para la artritis persistente erosiva. El área bajo la curva de eficacia diagnóstica fue de 0,84 para la distinción entre artritis de evolución limitada y la persistente y de 0,91 entre la artritis persistente no erosiva y la artritis persistente erosiva. Para los criterios de clasificación de la ACR (1987) los valores correspondientes eran considerablemente más bajos: 0,78 y 0,79 respectivamente.

Syversen y cols. evaluaron una cohorte longitudinal de pacientes con AR durante un periodo de 10 años y encontraron que los anti-CCP, FR IgM, VSG y el género femenino eran predictores independientes de progresión radiográfica. Propusieron que podían ser combinados en un algoritmo para una mejor predicción del daño radiológico. Además encontraron que los pacientes con niveles elevados de anti-CCP eran propensos a mayor progresión radiográfica concluyendo que el nivel de anti-CCP podría aportar valor pronóstico³⁸²

Se plantea la cuestión de que si los niveles de anti-CCP en suero tienen relevancia en el pronóstico de la enfermedad. En un estudio por Ursum y cols. se sugirió que no era el caso. Ellos afirmaron que aunque la positividad de anti-CCP en suero refleja una enfermedad más agresiva, la cantidad de anti-CCP en suero no era relevante³⁸³. De igual modo, Laki y cols. alcanzaron una conclusión similar al no encontrar diferencia de actividad en pacientes con cantidad moderada de anti-CCP frente aquellos con niveles altos³⁸⁴.

En un seguimiento durante 3 años de pacientes con AR temprana se observó que el estatus de los anti-CCP al momento del diagnóstico era un valioso predictor del curso de la enfermedad en términos de marcadores de actividad de la enfermedad:

PCR, VSG, DAS28, evaluación global de la enfermedad por el médico y el recuento de articulaciones inflamadas³⁸⁵ (Figura 27).

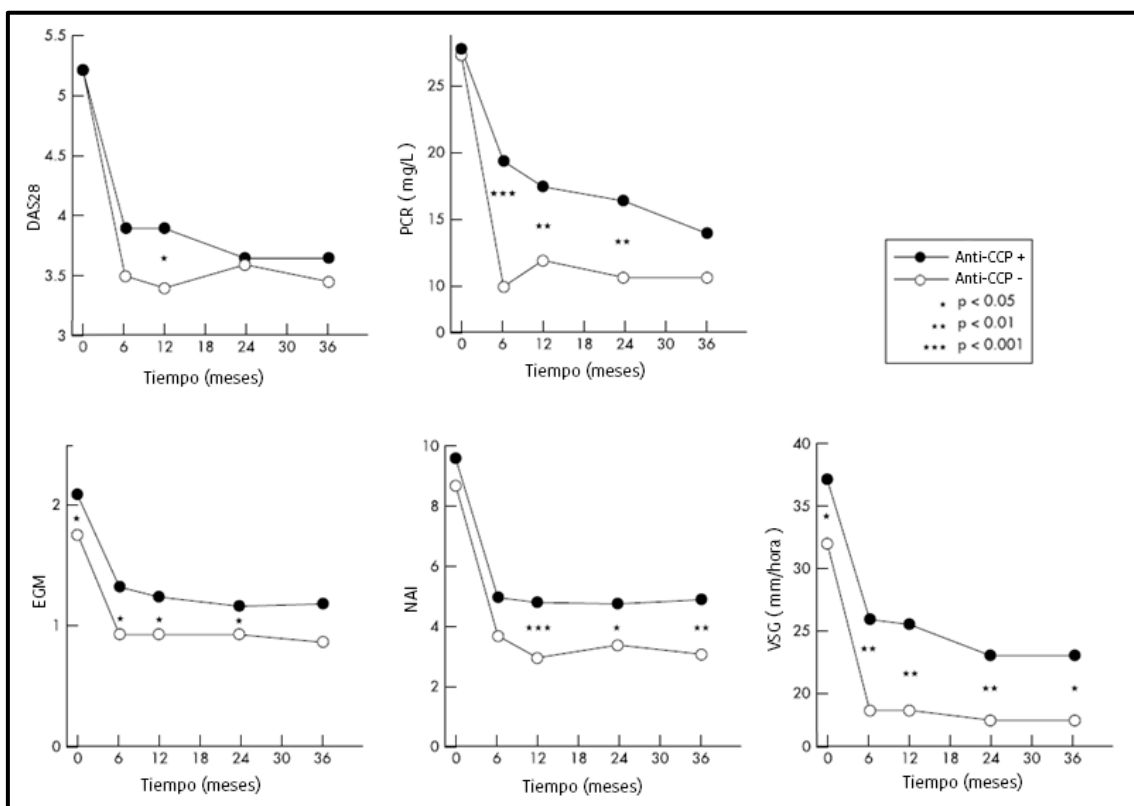


Figura 27. Actividad de la enfermedad medida durante tres años de seguimiento en pacientes con AR temprana. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico. Los marcadores de actividad evaluados fueron DAS28, PCR, VSG, NAI y EGM. La positividad para anti-CCP al diagnóstico predijo mayor actividad de la enfermedad durante los tres años de seguimiento. Tomado y traducido de Kastbom y cols³⁸⁵.

Rönnelid y cols. obtuvieron resultados similares en un estudio longitudinal durante 5 años de seguimiento. La presencia de anti-CCP al diagnóstico predijo un curso menos favorable de la enfermedad con mayor progresión radiológica³⁸⁶. No obstante, en otro estudio longitudinal realizado en una cohorte de pacientes españoles con AR durante dos años de seguimiento no se encontró diferencias para el DAS28 según la positividad para los anti-CCP³⁸⁷.

5) Monitorización de las intervenciones terapéuticas

Una disminución en los títulos de anti-CCP se puede observar en pacientes con un tratamiento precoz efectivo a base de terapia biológica junto con FARMES. No obstante, como se ha observado en varios estudios longitudinales, la disminución en

los títulos de anti-CCP es menos frecuente y de menor magnitud que la observada para el FR IgM³⁸⁸ (Tabla 11).

Tratamiento	Pacientes (n)	Seguimiento (semanas)	Disminución FR IgM (%)	Disminución Anti CCP (%)	Referencias
Infliximab/MTX	30	78	50	No apreciable	Bobbio-Pallavicini y cols. ³⁸⁹
Infliximab/MTX	62	46	65	25	Vis y cols. ³⁹⁰
Infliximab/MTX	43	24	20	15	Alessandri y cols. ³⁹¹
Infliximab/MTX	27	22	50	Sin efecto	Caramaschi y cols. ³⁹²
Infliximab/MTX	62	30	50	Sin efecto	De Rycke y cols. ³⁹³
Etanercept/MTX	90	12	36	31	Chen y cols. ³⁹⁴
Adalimumab/MTX	57	48	40	30	Atzeni y cols. ³⁹⁵

Tabla 11. Características de estudios longitudinales sobre los niveles de FR y anti-CCP durante el tratamiento con inhibidores del TNF- α . En los diversos estudios se señala el porcentaje de disminución de los títulos de FR y anti-CCP desde la visita inicial hasta el final del seguimiento de los pacientes.

En algunos de estos estudios se pone de manifiesto la importancia de los anti-CCP2 en la elección de la estrategia terapéutica a seguir. En uno de ellos, se indica que el tratamiento anti TNF- α en AR resulta en una disminución de los títulos séricos de FR y anti-CCP2 en pacientes que muestran mejoría clínica. Estos resultados sugieren que esas medidas pueden ser un complemento útil en la evaluación de la eficacia al tratamiento³⁹⁶.

En otro estudio en pacientes con AR, se han observado cambios en los títulos de los distintos isotipos de FR durante el tratamiento³⁹⁷. Una reducción en el título del FR se observó tras el tratamiento con infliximab en pacientes con AR refractaria, mientras que los anticuerpos anti-CCP no se modificaron. En este estudio se concluyó que los anti-CCP y el FR eran anticuerpos independientes en AR³⁹⁸.

Posteriormente Kozart y cols. evaluaron el potencial valor de los niveles de anti-CCP para medir la regresión de la enfermedad en pacientes tratados con infliximab. Encontraron que aunque la enfermedad mejoraba con el uso de infliximab, los niveles de anti-CCP no cambiaron. Este estudio evidenció que la cuantificación de los anti-CCP en pacientes con AR es inapropiada para monitorizar la terapia con infliximab³⁹⁹. Sin embargo, ellos encontraron una correlación entre la remisión de la

enfermedad y el FR IgM lo que parece indicar que es una medida efectiva para monitorizar el tratamiento. No obstante, en un reciente trabajo por Bohler y cols. se demostró que los niveles de anti-CCP y FR disminuyeron significativamente tras seis meses de terapia biológica. Esta reducción de ambos anticuerpos estuvo estrechamente relacionada con la reducción de la actividad de la enfermedad⁴⁰⁰.

En una cohorte de 188 pacientes con AR en tratamiento con adalimumab se demostró que la disminución en los niveles del FR IgM se asoció con un descenso en los valores de PCR y VSG lo que sugiere que el FR pudiera actuar como un marcador de actividad inflamatoria. En relación con los anti-CCP, los autores encontraron que el descenso en los niveles de los marcadores de inflamación no estaba relacionado con los anti-CCP positivos o con cambios en los niveles de anti-CCP. Concluyeron que los anti-CCP eran un marcador estable sin relación con la actividad de la enfermedad⁴⁰¹.

4.2.6 Anticuerpos anti-vimentina citrulinada (anti-Sa)

Los anti-Sa son otros anticuerpos relacionados que reaccionan con una proteína del citoesqueleto, la vimentina citrulinada. La vimentina citrulinada se ha descrito como un autoantígeno relevante expresado en el tejido sinovial. Esta proteína se ha aislado en bazo, placenta y pannus reumatoide⁴⁰². La sensibilidad de este anticuerpo es baja en las etapas iniciales pero aumenta conforme avanza la enfermedad^{403,404}. Estos anticuerpos son tres veces más prevalentes en pacientes con una enfermedad agresiva y erosiva.

En un estudio de seguimiento durante un año de pacientes con AR, la seropositividad para anti-Sa predijo un mayor recuento de articulaciones afectadas, más presencia de erosiones óseas y un tratamiento más agresivo⁴⁰³. Hueber y colaboradores demostraron que los anti-Sa presentaban una especificidad para AR aproximadamente del 98%⁴⁰⁵. En una revisión por Van Steendam y cols.⁴⁰⁶ se proporcionó tres argumentos sobre la importancia de la vimentina citrulinada en AR:

- 1) Los alelos del EC se encuentran estrechamente vinculados a anticuerpos contra vimentina citrulinada.
- 2) La vimentina citrulinada se encuentra presente en las articulaciones de los pacientes con AR.

- 3) Los péptidos con vimentina citrulinada se unen mejor a HLA-DR que los alelos sin vimentina citrulinada.

En base los resultados de esta revisión, los autores concluyeron que los anticuerpos anti-Sa eran mejor predictores de severidad de la enfermedad al compararlos con anti-CCP, FR y EC.

Sin embargo, el mayor inconveniente de estos anticuerpos es su sensibilidad significativamente menor en relación a los anti-CCP2. Así, en una comparación entre los anticuerpos anti-Sa y anti-CCP en una población clínica ambulatoria que consta de pacientes con AR, otras enfermedades del tejido conectivo y espondiloartropatías⁴⁰⁷ se observó que los anti-Sa presentaban una menor sensibilidad que los anti-CCP (44 frente a 72%, respectivamente) con una especificidad similar (96 frente a 94%, respectivamente). Los anti-CCP y anti-Sa fueron discordantes en 47 de 87 pacientes con AR. Los resultados sugieren que los anti-Sa pueden ser un ensayo complementario cuando los anti-CCP son negativos en pacientes con sospecha de AR.

4.2.7 Anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV)

Los anti-MCV son autoanticuerpos que reconocen una isoforma natural de vimentina la cual se encuentra en pacientes con AR y donde residuos de arginina han sido reemplazados por glicina^{408,409}. Esas proteínas mutadas no están necesariamente citrulinadas lo que nos llevaría a pensar que el ensayo anti-MCV sería capaz de detectar anticuerpos que no pueden ser detectados por el ensayo anti-CCP2⁴¹⁰. Sin embargo, en otro estudio fallaron en corroborar estos resultados. Encontraron que los anti-CCP2 presentaron mayor especificidad diagnóstica y valor predictivo que el FR y anti-MCV concluyendo que los anti-MCV son una herramienta diagnóstica inferior al compararlos con los anti-CCP2⁴¹¹.

El valor diagnóstico y pronóstico de los anti-MCV fue analizado en una revisión sistemática de 14 estudios realizada en el año 2010 donde la mayoría empleaban ensayos disponibles comercialmente⁴¹². Las conclusiones obtenidas fueron:

- En 10 estudios casos-control; la sensibilidad osciló del 64 al 84% mientras que la especificidad osciló del 79 al 96%.

- En los estudios casos-control, la especificidad de los anti-MCV para AR fue ligeramente menor que la especificidad para los anti-CCP.
- Se encontró una asociación moderada entre los anti-MCV y la progresión radiológica y comparable a la que presentan los anti-CCP.
- Ninguno de los estudios ha analizado el valor diagnóstico añadido de los anti-MCV a los anti-CCP y FR.
- La heterogeneidad de los estudios, la elección de la población de estudio y la metodología empleada han limitado la obtención de conclusiones en conjunto, especialmente en el estudio del valor pronóstico de los anti-MCV.

En un estudio posterior en donde se evaluó una cohorte longitudinal de pacientes con AR durante un periodo de 10 años, se encontró que los anti-MCV predijeron el daño articular de manera comparable a los anti-CCP. Los OR para la progresión radiográfica aumentaron tanto en presencia de los anti-MCV (OR=7,3; IC95% 3,2-16,5) como los anti-CCP (OR=5,7; IC95% 2,6-12,5). Los anti-MCV presentaron una asociación más fuerte con la progresión de las erosiones que con la disminución del espacio articular. El OR para la progresión radiográfica no sólo aumento con la presencia de los anti-MCV sino también se relacionó con niveles elevados de anti-MCV⁴¹³.

Recientemente se ha observado que un nivel positivo alto de anti-MCV se asocia a cambios destructivos más pronunciados en las articulaciones. Dicha asociación no se encontró para los anti-CCP y el FR IgM. En dicho estudio concluyeron que los pacientes con niveles altos de anti-MCV son especialmente propensos a una progresión radiográfica rápida y necesitaran un tratamiento agresivo precoz⁴¹⁴.

4.3 Otros anticuerpos en Artritis Reumatoide

La utilidad de otros anticuerpos en el diagnóstico y pronóstico de la AR es escasa. Los pacientes con AR pueden presentar muchos otros autoanticuerpos que no son específicos de la enfermedad entre los que destacamos los ANAs, anti RA33, anti-cardiolipina, ANCA, anti-glucosa-6-fosfato, anti-calpastatina y anti-colágeno tipo II.

4.3.1 Anticuerpos anti-ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2 (Anti-RA33)

Las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) son componentes esenciales de los espliceosomas. El sistema inmune de pacientes con AR, LES y EMTC reaccionan frente a este complejo funcional. Sin embargo, comparado con los pacientes con LES y EMTC, los pacientes con AR tienen una respuesta más restringida a los espliceosomas: presentan una respuesta inmune hacia la proteína A2 del componente hnRNPs pero no reaccionan con las proteínas del componente snRNPs. Los anticuerpos anti-RA33 son anticuerpos dirigidos contra la proteína A2 constituyente de la unidad hnRNPs de los espliceosomas⁴¹⁵. La presencia de anti-RA33 se asocia con la presencia de artritis en pacientes con LES y EMTC sugiriendo una relación entre este anticuerpo y la enfermedad articular inflamatoria autoinmune en general⁴¹⁶.

Se ha postulado que los anti-RA33 son un marcador precoz y estable de AR. En un estudio realizado en Austria se observó que siete pacientes con artritis precoz no diagnosticados como AR y con anti-RA33 positivos fueron clasificados como AR a los tres años de seguimiento. Estos resultados sugieren que los anti-RA33 ayudarían a discriminar AR precozmente de otras formas de artritis de inicio y, en ausencia de un diagnóstico establecido, serían predictivo de AR⁴¹⁷. No obstante, la presencia de anti-RA33 no se asocia con un riesgo aumentado de daño articular radiográfico progresivo⁴¹⁸.

4.3.2 Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)

La utilidad de los ANCA radica en el momento que aparece vasculitis como posible complicación en la AR. Los aspectos no relacionados con vasculitis de la actividad, severidad y cronicidad de la AR no han presentado una correlación consistente con el estatus de ANCA.

Sin embargo, en un estudio realizado en pacientes con AR precoz se encontró que los p-ANCA eran un marcador precoz de enfermedad erosiva progresiva durante un periodo de seguimiento de 7 años⁴¹⁹. No obstante, en pacientes con AR y ausencia de vasculitis sistémica, los ANCA presentan poca utilidad clínica.

4.3.3 Anticuerpos anti-alfa enolasa

En un estudio se encontró que los anticuerpos anti-alfa enolasa, un enzima de la ruta de la glucólisis, se encuentra presente en el suero de pacientes con AR reciente y podría tener valor diagnóstico y pronóstico en dichos pacientes⁴²⁰.

4.3.4 Anticuerpos anti-glucosa-6-fosfato isomerasa (anti-GPI)

La glucosa6-fosfato isomerasa es una enzima ubicua que interviene en la vía glucolítica. Se ha descrito títulos elevados de estos anticuerpos en suero y líquido sinovial de pacientes con AR⁴²¹. Los anti-GPI se encuentran presentes en un porcentaje muy bajo en pacientes con AR⁴²². Algunos datos sugieren que la prevalencia de anti-GPI se puede correlacionar con manifestaciones extraarticulares⁴²³.

4.3.5 Anticuerpos anti-alfa enolasa péptido-1 citrulinado (anti-CEP)

La positividad de anticuerpos frente a la alfa-enolasa péptido-1 citrulinado ha mostrado una alta asociación con los alelos del EC y el hábito tabáquico⁴²⁴. Sin embargo, el rol patogénico de estos anticuerpos no está claro debido en parte a la falta de asociación con la actividad de la enfermedad.

4.3.6 Anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL)

Al contrario que ocurre en el LES, en la AR no se ha relacionado a estos anticuerpos con el síndrome anti-fosfolípido. No obstante, se ha descrito que la presencia de estos anticuerpos en el contexto de una AR puede representar un factor de riesgo para la presencia de fenómenos trombóticos^{425,426}.

4.3.7 Anticuerpos antinucleares (ANAs)

Se han descrito en un 10-30% de pacientes con AR y son más frecuentes en pacientes con FR positivo, SS asociado o pacientes de edad avanzada. Normalmente presentan un patrón de IFI homogéneo (en su mayoría son anti-histonas) y a título bajo. Sin embargo, no se han descrito diferencias entre pacientes con AR según la presencia de ANAs. Los anticuerpos anti Ro/SSA se han relacionado con una

enfermedad más agresiva y con más manifestaciones extraarticulares. No se emplean en el diagnóstico clínico de la AR y su sensibilidad es del 52%.



II

Hipótesis & Objetivos

La AR es una enfermedad crónica que provoca un grave sufrimiento a la persona que la padece, provocando una discapacidad importante en fases evolucionadas de la enfermedad y con pérdida de la calidad de vida. Esta es una de las enfermedades que más discapacidad provocan siendo el impacto económico muy significativo tanto para la sociedad como para el paciente. Este impacto económico incluye disminución de la capacidad laboral, estrés en las relaciones, pérdida de oportunidades de trabajo y disminución de los ingresos económicos del individuo.

El diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad es fundamental porque reduce la actividad, la progresión y la mortalidad asociada. Con ello se evita el deterioro casi inevitable de las articulaciones del enfermo y por lo tanto mejora su calidad de vida. El diagnóstico de los pacientes se basa en los criterios de clasificación de la ACR de 1987. Sin embargo, estos criterios no son útiles en las etapas iniciales de la enfermedad. Para ello, la ACR y la EULAR desarrollaron conjuntamente en 2010 nuevos criterios de clasificación que son útiles en las fases tempranas de la enfermedad.

Estos criterios nuevos introducen cambios en la valoración clínica y dan mucha importancia a los hallazgos analíticos: marcadores serológicos (FR y anti-CCP) y reactantes de fase aguda (PCR y VSG). Además, la enfermedad tiene un importante componente genético definido por el EC HLA-DRB1 cuya presencia se asocia a formas más severas de la enfermedad.

La determinación de los marcadores serológicos junto con el EC permitirá identificar los individuos que acuden a las consultas con artritis de inicio y presentan una mayor predisposición al desarrollo de formas graves y agresivas de la enfermedad. Así, estos pacientes se podrán beneficiar de un tratamiento precoz y eficaz evitando el avance de la enfermedad y los problemas asociados a ella.

Hipótesis 1: La utilidad diagnóstica (S, E, VPP, VPN, LR+, LR- y área bajo la curva ROC) de los marcadores bioquímicos (FR, anti-CCP y EC) en el diagnóstico de la AR de inicio en una cohorte de enfermos que se atienden en una consulta especializada de reumatología es elevada.

Hipótesis 2: Dentro de los factores etiológicos asociados a AR; el hábito tabáquico (factor ambiental) y el EC HLA-DRB1 (factor genético) interaccionan entre sí e influyen en los niveles de los autoanticuerpos FR y anti-CCP.

Hipótesis 3: Los marcadores bioquímicos (FR, anti-CCP y EC) son útiles para establecer pronóstico ya que permiten identificar subgrupos de pacientes con AR de inicio con diferentes niveles de gravedad de la enfermedad.

3

Objetivos del estudio

3.1 Objetivo General

Determinar la relación entre FR, anti-CCP y EC con el diagnóstico y pronóstico de pacientes que acuden por primera vez a la consulta de artritis precoz de la Unidad de Reumatología con sospecha de AR.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Calcular la prevalencia de AR en una consulta especializada de artritis precoz.
- b) Calcular la prevalencia de otras enfermedades reumáticas en una consulta especializada de artritis precoz, como parte del diagnóstico diferencial.
- c) Describir las variables demográficas, clínicas y bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio.
- d) Describir la prevalencia del FR, anti-CCP y EC en los sujetos incluidos.
- e) Determinar el valor diagnóstico del FR, anti-CCP y EC en los sujetos que acuden a las consultas en términos de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LR+, LR- y curvas ROC.
- f) Determinar la asociación existente entre el FR, anti-CCP y EC en los pacientes diagnosticados de AR.
- g) Determinar el efecto de la interacción entre el EC y el hábito tabáquico sobre el FR y los anti-CCP en los pacientes diagnosticados de AR.

- h) Describir la relación existente entre los marcadores bioquímicos y las variables clínicas de gravedad de la enfermedad al momento del diagnóstico en los pacientes diagnosticados de AR.

- i) Determinar el valor pronóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes diagnosticados de AR en la visita inicial.



III

Materiales & Métodos

1

Población y ámbito de estudio

El estudio se realizó en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla; área con una población asignada como hospital de referencia provincial de 483.618 usuarios. Esta población asignada corresponde a los distritos de Sevilla (270.444 usuarios), Sevilla Norte (209.566 usuarios) y Guadalquivir (3.608 usuarios). La población de estudio se formó por pacientes con artritis de inicio que acudieron por primera vez a la Consulta de la Unidad de Artritis Precoz del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena. Esta consulta se inició en 2005 a cargo de un único Reumatólogo tratante con 13 años de experiencia en el diagnóstico de patología reumática inflamatoria. Los pacientes que acudían a dicha consulta eran referidos desde atención primaria predominantemente (90%), de otras especialidades o consulta de urgencias.

2

Diseño del estudio

En la realización de este estudio de investigación se han seguido las distintas etapas de la metodología científica. En una **primera etapa**, tras reuniones con las directoras de la tesis, se marcó un objetivo inicial y se procedió a una revisión bibliográfica con la finalidad de elaborar un marco teórico que sirviera de guía para el diseño del estudio. Dicha revisión versó sobre marcadores clínicos y bioquímicos con valor diagnóstico y pronóstico en artritis reumatoide. A partir de ahí, se definió el objeto de la investigación y se diseñaron las hipótesis del estudio.

En una **segunda etapa**, se plantearon los objetivos específicos del estudio así como las características de los individuos que compondrían el estudio, las variables de estudio y los recursos materiales y humanos necesarios para llevarlo a cabo. Se diseñó un estudio cuyos fundamentos metodológicos están basados en:

- Establecer grupos de estudio y las características de cada uno de ellos.

- Recopilar para cada uno de los sujetos incluidos en el estudio las variables demográficas, clínicas y bioquímicas potencialmente relacionadas con los objetivos fijados.

En la **tercera y última etapa**, se procedió al análisis y tratamiento estadístico de los datos y representación de resultados terminando con la obtención de las conclusiones del estudio.

Para ello, se diseñó un estudio analítico observacional, ambispectivo y longitudinal (3 años) de una población de pacientes que acudieron con artritis de inicio a las Consultas de la Unidad de Artritis Precoz. Es un estudio prospectivo a partir del diagnóstico y retrospectivo en relación con la consulta de los datos. Para ello, se consultaron las historias clínicas de los pacientes previamente solicitadas a la Unidad de Archivo del Hospital recogiendo las variables y parámetros definidos. Las historias fueron solicitadas al administrativo de la Unidad de Archivo mediante la hoja de solicitud debidamente cumplimentada con los datos del solicitante y motivo de consulta de la historia clínica requerida.

En aquellos casos en los que no estaba registrado en la historia clínica algún resultado de las variables bioquímicas, éstas se han obtenido a través del archivo del sistema informático (LIS) de la Unidad de Bioquímica Clínica del hospital. La revisión de los resultados de los parámetros bioquímicos y clínicos no repercutió en la atención del paciente. Todos los datos existentes en las historias clínicas de los pacientes y analizados en este estudio han sido solicitados por el reumatólogo de forma rutinaria para la atención del paciente con sospecha de AR.

3 Periodos de tiempo

El periodo de estudio fue desde Enero de 2008 hasta Diciembre de 2011. El periodo de recogida de datos se inició en Enero de 2010 hasta Diciembre de 2011 con una duración de 2 años.

4 Aspectos éticos de la investigación

El proyecto de investigación fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla (Anexo 1). En todo momento se respetaron los principios de equidad, confidencialidad, respeto, no maleficencia y demás requisitos anotados en las Guías de Buena Práctica Clínica⁴⁴⁷.

Se asignó un código numérico a cada enfermo y la identificación del paciente estuvo resguardada en el Hospital con el fin de asegurar la confidencialidad en el manejo de los datos. Debe entenderse que en ningún momento este proyecto significó una modificación en la conducta clínica habitual ni en los tratamientos a seguir en los pacientes.

5 Pacientes y controles Criterios de inclusión y exclusión

5.1 Pacientes

Los pacientes se seleccionaron consecutivamente de la Consulta de la Unidad de Artritis Precoz del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena. Los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes fueron confirmados para cada uno de los pacientes del estudio.

- **Criterios de inclusión:** para la inclusión de cada paciente en nuestro estudio fue condición indispensable:
 1. Consulta en la Unidad de Artritis Precoz del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Virgen Macarena.
 2. La determinación del EC HLA-DRB1.
 3. La determinación de los autoanticuerpos (anti-CCP y FR) en la visita inicial.

- **Criterios de exclusión:** se excluyeron aquellos pacientes que presentaron algunas de las siguientes características:
 1. Ausencia de diagnóstico confirmado.
 2. Pacientes menores de 18 años de edad.
 3. Pacientes no valorados por el Servicio de Reumatología.

Se seleccionaron consecutivamente 229 pacientes que acudieron al Hospital Universitario Virgen Macarena con artritis de inicio y que satisfacían los criterios de inclusión. Tras la aplicación de los criterios de exclusión, este grupo quedó reducido a **211 pacientes**. En los 18 pacientes excluidos las causas de exclusión fueron la ausencia de diagnóstico confirmado en 15 pacientes y edad inferior a 18 años en 3 pacientes.

5.2 Controles sanos

Individuos sanos (principalmente cónyuges y amigos) que acompañaron a los pacientes a la Unidad de Artritis Precoz del Servicio de Reumatología y sin relación génica con los pacientes. Se les realizó una extracción de sangre en la Unidad de Extracciones del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena previa información y obtención de consentimiento informado (Anexo 2). Este grupo estuvo formado por **65 sujetos sanos** en los que se confirmaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterio de inclusión (controles)**
 1. Individuos pareados en edad (\pm 4 años), sexo y hábito tabáquico con los pacientes con AR.
- **Criterios de exclusión (controles)**
 1. Sujetos con otra enfermedad inflamatoria (articular o sistémica), infecciosa o autoinmune.
 2. Velocidad de sedimentación o proteína C reactiva elevadas.
 3. Patología concomitante que pudiera interferir en la interpretación de los resultados.

6 Diagnóstico de los pacientes y grupos de estudio

A los pacientes que acudieron a las Consultas de Artritis Precoz y con objeto de establecer el diagnóstico de AR, se emplearon como criterios los dos siguientes “*gold standard*” o patrones oro:

- 1) Según el juicio clínico del reumatólogo tratante.
- 2) Según los criterios de clasificación de la ACR de 1.987. El clínico consideró que el paciente tenía AR al reunir cuatro o más criterios. Cabe señalar que cuando se inició el proyecto los Criterios de Clasificación del ACR/EULAR no estaban disponibles ya que fueron publicados con posterioridad.

De acuerdo a estos dos criterios, los **211 pacientes incluidos** en el estudio se clasificaron en dos grupos definidos a continuación:

- **Grupo AR:** formado por 106 pacientes que fueron diagnosticados de AR según el juicio clínico del reumatólogo tratante y apoyados en los criterios de clasificación de la ACR 1987.
- **Grupo NOAR:** constituido por 105 pacientes que fueron diagnosticados de otras enfermedades reumáticas distintas a la AR. El diagnóstico de estas enfermedades reumáticas se estableció según los distintos criterios diagnósticos o de clasificación vigentes^{7,427-435}.

A estos dos grupos de pacientes se les sumó el tercer grupo de sujetos controles:

- **Grupo CONTROL:** formado por 65 sujetos sanos con las características definidas en el apartado anterior.

Los 106 pacientes diagnosticados de AR se siguieron durante un periodo de 3 años. A los 12 meses, el grupo se redujo a 82 pacientes, disminuyendo a 68 pacientes a los 24 meses y a 59 pacientes a los 36 meses (Figura 28).

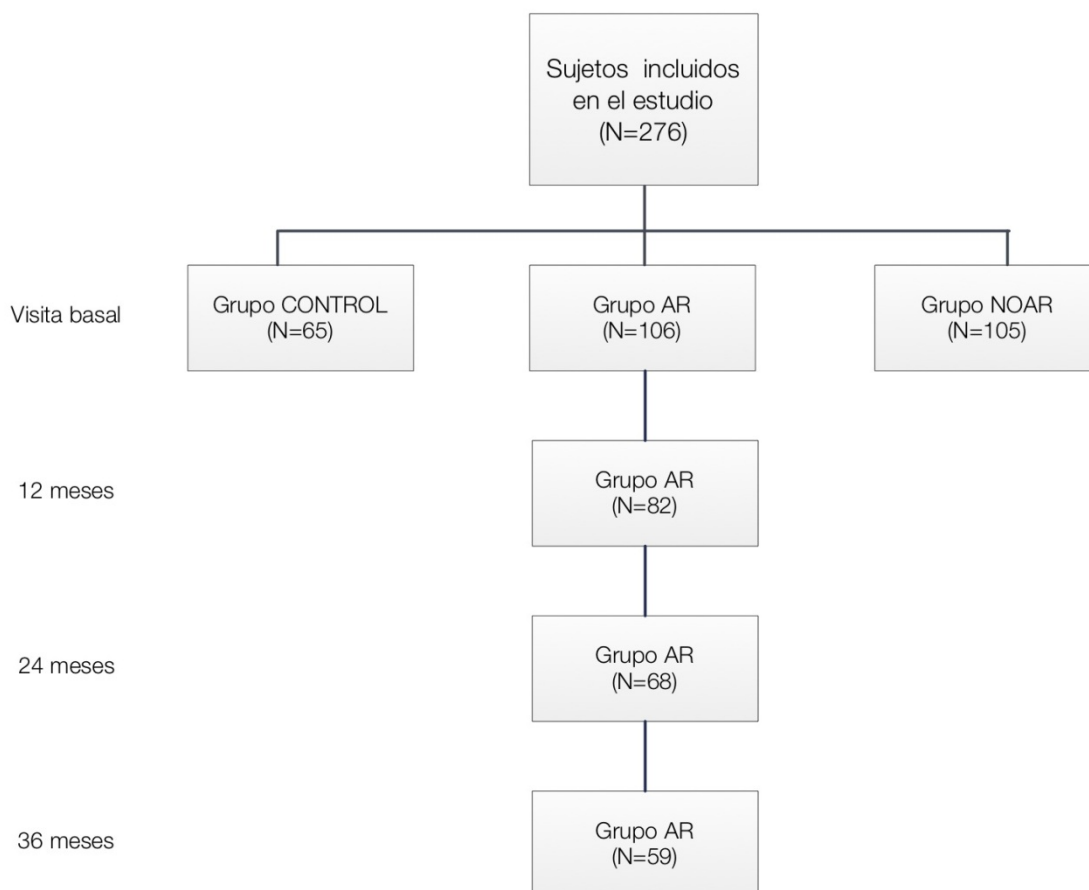


Figura 28. Grupos de pacientes incluidos en el estudio.

7 Evaluación de los pacientes por el reumatólogo

La primera evaluación de un paciente con AR en la consulta del reumatólogo incluye la historia clínica, exploración física, pruebas radiográficas y analítica de sangre.

En la **historia clínica** se anotan los datos personales del paciente, los datos sociodemográficos y los antecedentes familiares y personales. Los datos sociodemográficos incluyen el sexo, la edad, el nivel de estudios y la situación laboral. También se recopila los hábitos tóxicos del paciente; consumo de alcohol, hábito tabáquico calculando el índice de tabaquismo y consumo de drogas.

En los **antecedentes familiares y personales** se recopilan: antecedentes familiares de AR y otras patologías reumáticas, intervenciones quirúrgicas, alergias, transfusiones, etc. El clínico también interroga por la historia previa de la enfermedad así como el tiempo de evolución, sus manifestaciones clínicas y si ha recibido tratamiento previo.

La **exploración física** del paciente incluye una evaluación detallada del aparato locomotor con especial atención a la presencia de tumefacción, dolor, deformidades, presencia de nódulos subcutáneos, alteraciones cutáneas y cualquier otro síntoma relacionado con la artritis.

Las **pruebas de laboratorio** realizadas al paciente consisten en un hemograma, reactantes de fase aguda (PCR y VSG), FR, EC, anti-CCP, bioquímica hepática (GOT, GPT, GGT, fosfatasa alcalina y albúmina) y renal (creatinina, urea, glucosa, sodio, potasio), calcio, proteínas y análisis básico de orina. También se les solicitan ANAs y serología hepática (virus B y C de la hepatitis). En caso de duda y si fuera necesario, se solicitan otras pruebas según indicación clínica como anti-DNA, ANCA, anticuerpos frente al parvovirus B-19, etc.

En esta evaluación inicial del paciente y en las de seguimiento de la enfermedad se valorará un conjunto de parámetros que nos permiten conocer el grado de actividad inflamatoria, de discapacidad funcional y de daño estructural de la enfermedad. Todas estas variables se recogen en una hoja o formulario de seguimiento del paciente (Anexo 3).

7.1 Parámetros que miden el grado de actividad inflamatoria

En la evaluación del grado de actividad inflamatoria el reumatólogo emplea el recuento de articulaciones dolorosas y tumefactas, la evaluación del dolor, la evaluación global de la enfermedad por el paciente y el clínico, la determinación de los reactantes de fase aguda (PCR y VSG) y el índice de actividad compuesto DAS28.

a) Recuentos articulares

El reumatólogo realiza un recuento simplificado de 28 articulaciones mediante métodos validados. Los recuentos articulares se basan en la cuantificación de la presencia o ausencia de dolor (**“número de articulaciones dolorosas basado en 28**

articulaciones” o NAD) y tumefacción (“número de articulaciones tumefactas o inflamadas basado en 28 articulaciones” o NAI). Las articulaciones dolorosas o tumefactas se van señalando en homúnculos empleados para ello (Figura 29). Las articulaciones incluidas en el recuento son las interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, hombros y rodillas.

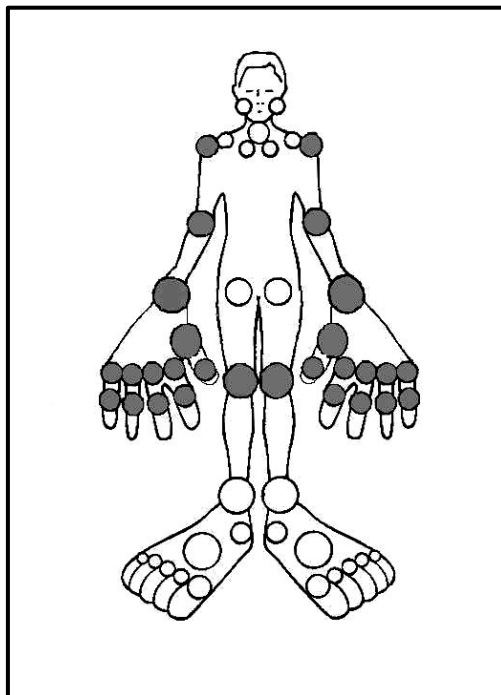


Figura 29. Homúnculos empleados para el recuento de articulaciones dolorosas e inflamadas. Para cada paciente se realiza el **recuento de articulaciones dolorosas** y el **recuento de articulaciones tumefactas o inflamadas**. Las 28 articulaciones que se emplean en el recuento se encuentran marcadas en gris en el homúnculo.

b) Evaluación del dolor

La evaluación del dolor (**EVA**) la realiza el propio enfermo y con una escala visual numérica horizontal de 10 cm dividida en 10 segmentos iguales de 1 cm mediante marcas verticales (Figura 30). En esta escala, los extremos están marcados con los indicadores que indican “ningún dolor” (0) o “máximo dolor” (10).

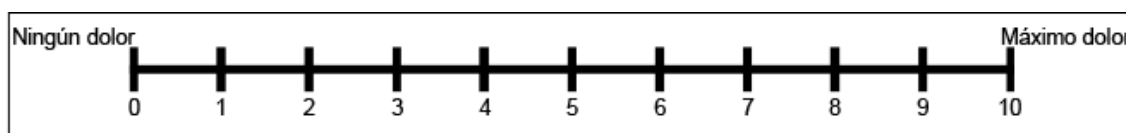


Figura 30. Escala empleada para la evaluación del dolor por el paciente, la evaluación global de la enfermedad por el paciente y por el médico.

c) Evaluación global de la enfermedad

La **evaluación global de la enfermedad** es realizada desde la perspectiva tanto del **paciente (EGP)** como del **médico (EGM)**. Al igual que para la evaluación del dolor, se emplea una escala visual numérica horizontal de 10 cm dividida en 10 segmentos iguales de 1 cm mediante marcas verticales (Figura 30). En esta escala, los extremos están marcados con indicadores que indican “muy bien” (0) o “muy mal” (10).

d) Reactantes de fase aguda

Los reactantes de fase aguda (VSG y PCR) están relacionados con la actividad inflamatoria de la enfermedad. La medición de estos reactantes son de gran ayuda en el seguimiento de los procesos inflamatorios y sus niveles están asociados a la intensidad de la inflamación subyacente. Se encuentran incluidos dentro de las determinaciones de laboratorio rutinarias.

e) Índice de actividad compuesto DAS28

El empleo de los índices de actividad compuestos resume la información de varios parámetros en un solo indicador y son válidos para la evaluación de la actividad de la enfermedad. **El DAS28 es un índice basado en el recuento de 28 articulaciones dolorosas y tumefactas y que emplea la VSG en su formulación.** Este índice se define según la ecuación⁴³⁶:

$$\text{DAS28 (4v)} = 0,56(\sqrt{\text{NAD}}) + 0,28(\sqrt{\text{NAI}}) + 0,70(\ln \text{VSG}) + 0,014(\text{EGP})$$

El parámetro EGP hace referencia a la evaluación global de la enfermedad efectuada por el paciente previamente definido. La escala que se emplea para el EGP en la ecuación es de tipo analógica por lo que hay que convertir las puntuaciones de la escala numérica que va de 0 a 10 en sus correspondientes valores de 0 a 100 para el cálculo del índice. Existe una formulación alternativa que emplea tres variables (NAD, NAI y VSG) en vez de cuatro:

$$\text{DAS28 (3v)} = [0,56(\sqrt{\text{NAD}}) + 0,28(\sqrt{\text{NAI}}) + 0,70(\ln \text{VSG})] \cdot 1,08 + 0,16$$

Los valores del índice DAS28 varían entre 0 y 10 y constituyen la base de los criterios de mejoría de la EULAR. La actividad inflamatoria puede variar dependiendo del paciente, del momento evolutivo o de la respuesta al tratamiento. Se distinguen cuatro estados de actividad inflamatoria: remisión, actividad baja, moderada o alta. Según los valores del DAS28 y atendiendo a la definición original o la definición actual basada en el consenso de reumatólogos experimentados; el clínico clasifica la actividad inflamatoria del paciente según los puntos de corte definidos a tal efecto (Tabla 12).

Actividad inflamatoria	Definición original	Definición actual recomendada
Remisión	< 2,6	< 2,4
Actividad baja	< 3,2	< 3,6
Actividad moderada	3,2 < DAS28 < 5,1	3,6 < DAS28 < 5,5
Actividad alta	≥ 5,1	≥ 5,5

Tabla 12. Clasificación de la actividad inflamatoria del paciente según la definición original⁴³⁷ y la definición actual recomendada⁴³⁸ para el índice de actividad DAS28.

El DAS28 basado en la VSG ha sido extensamente validado para su uso en ensayos clínicos en combinación con los criterios de respuesta de la EULAR⁴³⁹⁻⁴⁴¹. Se ha desarrollado una formulación alternativa que emplea la PCR (DAS28-PCR) en vez de la VSG y que también se formula con cuatro y tres variables. Ambos son instrumentos recomendados para la medición de la actividad de la AR en la práctica clínica.

$$\text{DAS28-PCR (4v)} = 0,56(\sqrt{\text{NAD}}) + 0,28(\sqrt{\text{NAI}}) + 0,36(\ln(\text{PCR}+1)) + 0,014(\text{EGP}) + 0,96$$

$$\text{DAS28-PCR (3v)} = [0,56(\sqrt{\text{NAD}}) + 0,28(\sqrt{\text{NAI}}) + 0,36(\ln(\text{PCR}+1))] \cdot 1,10 + 1,15$$

El DAS28-PCR se correlaciona bien con el DAS28 (valores de $r > 0,9$) pero con tendencia a dar valores absolutos más bajos que éste por lo que ambos índices no son

intercambiables. El DAS28-PCR parece infravalorar la actividad de la enfermedad de 0,5 a 1 puntos y, consecuentemente, sobrevalora la respuesta a los tratamientos respecto al DAS28, sobreestimando la mejoría en hasta el 10-12% de casos^{442,443}. En ambos cálculos es importante introducir en la fórmula la VSG en mm/h y la PCR en mg/dL.

En este estudio hemos empleado el **índice DAS28 que emplea la VSG y basado en 3 variables y para clasificar la actividad inflamatoria del paciente se ha empleado la definición actual recomendada** referida en la Tabla 12. Excluimos el uso del índice DAS28 con cuatro variables debido a la variabilidad por parte del paciente a la hora de definir la puntuación en el índice EGP y a la falta del dato en la historia clínica de algunos pacientes.

7.2 Evaluación de la discapacidad del paciente

La discapacidad física del paciente atribuida a la enfermedad se mide mediante el cuestionario **HAQ (Health Assessment Questionnaire)**. El HAQ es un cuestionario estandarizado que se basa en la opinión del enfermo sobre su enfermedad. Este cuestionario evalúa aquellos aspectos de la salud del paciente que se ven más afectados por la enfermedad.

Consta de 20 ítems sobre la discapacidad física percibida para realizar actividades básicas de la vida cotidiana agrupadas en ocho áreas denominadas de la “a” hasta la “h”: vestirse y asearse, levantarse, comer, caminar y pasear, higiene personal, alcanzar, prensión y otras actividades (Anexo 4). **El HAQ se puntúa de 0 (excelente función física) a 3 (muy mala función física).**

7.3 Evaluación del daño estructural

Para la evaluación del daño estructural se emplea la presencia o ausencia de erosiones evaluada cualitativamente mediante radiografías de manos y pies. Las radiografías se repetirán con una periodicidad anual durante la evolución de la enfermedad. La presencia de erosiones y la rapidez con la que aparecen se asocian a un peor pronóstico.

8.1 Obtención de las muestras biológicas

La obtención de las muestras biológicas tuvo lugar en la Sala de Extracciones de la Unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena. Se realizó mediante punción en la vena antecubital, obteniéndose sangre venosa y recolectándose en los siguientes contenedores:

- a) Tubo seco siliconado con gel separador y paredes siliconadas para la obtención del suero tras coagulación de la muestra. Se recolectan aproximadamente 7 ml de sangre para la determinación del factor reumatoide, anticuerpos anti-CCP, PCR y ANAs.
- b) Tubo de EDTA-K₃ que inhibe el proceso de coagulación eliminando el calcio de la sangre. Se recolectan 7 ml para la determinación del EC y VSG.

Las muestras extraídas son enviadas al laboratorio para su procesamiento y realizar los análisis pertinentes. Las muestras en tubo con gel separador, una vez coaguladas, se centrifugan a 3500 rpm durante 6 minutos y tras ello se obtiene el suero y se procede a realizar las determinaciones correspondientes. Las muestras en tubo de EDTA-K₃ no se centrifugan y realizan las determinaciones directamente.

8.2 Determinación de anticuerpos anti-CCP

Para la determinación de los anti-CCP se emplea un análisis cuantitativo ELISA que detecta anticuerpos IgG anti-CCP3 en suero del paciente (QUANTA Lite™ CCP3 IgG ELISA de INNOVA Diagnostics Inc., San Diego, USA). Para ello emplea un péptido de tercera generación denominado **CCP3 que presenta un 5% más de sensibilidad en la detección de pacientes con AR que los péptidos de segunda generación ó CCP2**. Este ensayo basado en péptido de tercera generación es el que

se emplea de rutina en nuestro laboratorio por lo que las determinaciones de anti-CCP se han realizado con dicho ensayo.

a) Procedimiento de trabajo

El antígeno usado en esta técnica es un péptido sintético cíclico con citrulina de gran sensibilidad y especificidad. El antígeno se encuentra unido a una placa con micropocillos. Cada uno de los calibradores, controles prediluidos y sueros diluidos del paciente se añaden al pocillo correspondiente. A continuación, cualquier anticuerpo IgG anti-CCP presente se une al antígeno inmovilizado. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade el conjugado anti IgG humano marcado con peroxidasa de rábano a cada pocillo. Un segundo paso de incubación permite que el conjugado se una a los anticuerpos presentes. Tras un lavado se elimina el conjugado sobrante, se añade un sustrato cromogénico y se incuba de forma que la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. El ensayo puede ser evaluado fotométricamente comparando la intensidad de color en las muestras con la de los estándares.

b) Procedimiento del ensayo

El procesamiento analítico y el cálculo de los resultados están automatizados en el autoanalizador Zenit SP+ (Menarini Diagnostics, Florence, Italy). El procedimiento del ensayo consta de los siguientes pasos:

- 1) Todos los reactivos han de estar a temperatura ambiente (20-26 °C) antes de empezar el ensayo. Poner el número necesario de tiras en el soporte.
- 2) Agregar 100 µl de los controles prediluidos CCP3 IgG ELISA positivo débil, CCP3 IgG ELISA positivo fuerte, CCP3 IgG ELISA calibradores, ELISA negativo y las muestras diluidas en los pocillos correspondientes. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en una superficie plana. El tiempo de incubación empieza después de la adición de la última muestra.
- 3) Lavado: aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300 µl de solución de lavado a todos los pocillos y aspirar. Repetir esta secuencia dos veces más para un total de tres lavados. Es importante que cada pocillo esté

completamente vacío después de cada paso de lavado. Mantener la misma secuencia para la aspiración que la usada para la adición de muestras.

- 4) Agregar 100 μ l de conjugado IgG HRP a cada pocillo. El conjugado se debe tomar con una pipeta en las condiciones más asépticas posibles y siguiendo buenas técnicas de laboratorio. Aspirar solamente la cantidad de conjugado necesaria para el ensayo. Para evitar cualquier contaminación potencial microbiana y/o química, nunca devolver el conjugado sin usar a su recipiente original. Incubar los pocillos 30 minutos como en el paso 2.
- 5) Lavado: repetir el paso 3.
- 6) Agregar 100 μ l de cromógeno TMB a cada pocillo e incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- 7) Agregar 100 μ l de solución de parada a cada pocillo. Mantener la misma secuencia y temporalización que la efectuada en la adición de cromógeno. Agitar suavemente la placa para mezclar bien los pocillos.
- 8) Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un plazo máximo de una hora. Se emplea el método de lectura bicromática utilizando 620 nm como longitud de onda de referencia.
- 9) Para considerar válidos los resultados deben considerarse satisfechos todos los criterios especificados a continuación, si alguno de ellos no se cumple la prueba debe considerarse inválida y repetirse.
 - La absorbancia del control CCP3 IgG positivo fuerte debe ser superior a la del control CCP3 IgG positivo débil y la de este debe ser superior a la del control negativo.
 - El control CCP3 IgG positivo fuerte debe tener una absorbancia mayor que 1,0 mientras que la del control negativo no debe exceder de 0,2.
 - La absorbancia del control CCP3 IgG positivo débil debe ser superior al doble del control negativo, u oscilar alrededor de 0,25.

- Los controles ELISA negativo y CCP3 IgG positivo fuerte están pensados para monitorizar problemas de reactivo de magnitud substancial. El control CCP3 IgG positivo fuerte no puede asegurar precisión alguna en el punto de corte del ensayo. Si lo hará el control positivo débil.

c) Cálculo de resultados cuantitativos

Para calcular los resultados se emplea el procedimiento cuantitativo con el empleo de una curva de calibrado:

- Determinar el valor medio para todas las lecturas duplicadas
- Trazar la absorbancia media de las muestras en la curva estándar según sus valores en unidades. Utilizar el polinomio de interpolación cúbica (polinomio de tercer orden) o un ajuste de línea punto a punto para trazar la curva.
- Determinar la concentración desconocida de CCP3 en unidades en el eje X a partir de la absorbancia correspondiente en el eje Y.

d) Interpretación de los resultados

La técnica ELISA es muy sensible y es capaz de detectar pequeñas diferencias entre poblaciones de pacientes. Los valores presentados a continuación son sólo valores sugeridos. Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en su propia metodología, controles, equipo y población de pacientes. La muestra puede clasificarse con un valor negativo, positivo débil, positivo moderado o positivo fuerte según la tabla siguiente:

<u>Resultado</u>	<u>Unidades (U/mL)</u>
Negativo	<20
Positivo débil	20-39
Positivo moderado	40-59
Positivo fuerte	≥60

- Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos anti-CCP3 IgG y sugiere la posibilidad de AR.

- Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos anti-CCP3 IgG o niveles inferiores al punto de corte del ensayo.
- Se sugiere que el laboratorio informe del equipo empleado. Los valores obtenidos con equipos de diferentes fabricantes pueden variar y no pueden intercambiarse entre ellos.

En el laboratorio empleamos un **punto de corte de 40 U/mL para considerar un resultado positivo**. El ensayo presentó un CV intra- e interensayo de <8,0% y <7,0%, respectivamente.

8.3 Determinación del Factor Reumatoide

El FR se determina en una muestra de suero humano mediante un método inmunoturbidimétrico potenciado con látex en el autoanalizador ADVIA 2400 de ADVIA® Chemistry Systems (Siemens Healthcare Diagnostics, Illinois, USA). El FR son anticuerpos dirigidos contra el fragmento Fc de la IgG. La mayoría de los FR son anticuerpos IgM, pero pueden ser IgG e IgA. Este método inmunoturbidimétrico potenciado con látex que mide la concentración de FR en suero, se basa en el principio de que la concentración del analito depende de la intensidad de la luz dispersada causada por los agregados de látex. Las partículas de látex recubiertas con el anticuerpo se aglutinan rápidamente en la presencia de FR, dando lugar a la formación de agregados.

a) Principios del procedimiento

El reactivo de látex para el FR es una suspensión de partículas uniforme de látex de poliestireno recubiertas de IgG humana. Cuando se mezcla suero que contiene FR con el reactivo de látex, se produce una aglutinación que da lugar a un aumento de turbidez. Esta turbidez puede medirse a 571 nm. La concentración de FR en el suero se determina a partir de una curva de calibración.

b) Valores esperados

El rango de referencia para este método es <20 UI/mL. Estos rangos se proporcionan únicamente como referencia. Como en el caso de cualquier otro análisis

diagnóstico, cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. En el laboratorio empleamos el **punto de corte de 20 UI/mL para considerar un resultado positivo**. El ensayo presentó un CV intra- e interensayo de <3,4% y <3,5%, respectivamente.

8.4 Determinación del Epitopo Compartido

Para la determinación del EC se emplea una técnica de hibridación reversa que es una variante de hibridación en fase soluble (conjunto de técnicas en las que la primera hibridación tiene lugar en fase soluble, en contraste con las técnicas de hibridación en fase sólida).

Para ello, el ADN extraído es sometido a una PCR con mezclas de cebadores preparados de modo que se obtiene la amplificación de la secuencia deseada. En nuestro caso, consiste en amplificar la gran mayoría de variantes conocidas del gen HLA DRB1 y otros dos genes comunes (SSB y α -1-antitripsina) que sirven como control positivo de la PCR.

Para ello se emplean 4 mezclas de cebadores (Primers Nucleotides Mix for Shared Epitope 1, 2, 3 y 4) en cuatro reacciones independientes de PCR y que se denominan: PN MIX SE1, PN MIX SE2, PN MIX SE3 Y PN MIX SE4.

El ADN amplificado por PCR es desnaturalizado y mezclado con sondas de detección libres acopladas a biotina. En este momento, el conjunto es puesto en contacto con tiras en las cuales existen, inmovilizadas, sondas de captura con secuencias correspondientes a los oligonucleótidos que queremos detectar. Posteriormente, el ADN no hibridado es lavado.

Por último, se añade anticuerpos anti-biotina conjugados con fosfatasa alcalina unida a estreptavidina. Añadiendo a continuación el sustrato correspondiente (BCIP/NBT) se observa un cambio de color en la zona donde se produjo la hibridación. De este modo, se obtienen patrones característicos para cada subtipo de epitopo compartido (si existen) así como sondas que sirven de control de la PCR.

En el Anexo 5 se encuentra detallado el proceso de determinación del EC.

8.5 Determinación de la Proteína C Reactiva

La PCR se determina en una muestra de suero mediante un método inmunturbidimétrico potenciado con látex en el autoanalizador ADVIA 2400 de ADVIA® Chemistry Systems (Siemens Healthcare Diagnostics, Illinois, USA). Esta determinación se emplea para la detección y evaluación de infecciones, daño tisular, procesos inflamatorios y enfermedades asociadas. Los incrementos en los valores de PCR no son específicos de muchas enfermedades por lo que no deberían ser interpretados sin una evaluación clínica completa.

Este método inmunturbidimétrico potenciado con látex que mide la concentración de PCR en suero se basa en el principio de que la concentración del analito depende de la intensidad de la luz dispersada causada por los agregados de látex. Las partículas de látex recubiertas con el anticuerpo se aglutinan rápidamente en la presencia de PCR, dando lugar a la formación de agregados.

a) Principios del procedimiento

El reactivo de látex para la PCR es una suspensión de partículas uniforme de látex de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-PCR. Cuando se mezcla suero que contiene PCR con el reactivo de látex, se produce una aglutinación que da lugar a un aumento de turbidez. Esta turbidez puede medirse a 571 nm. La concentración de PCR en el suero se determina a partir de una curva de calibración obtenida con un juego de calibradores.

b) Valores esperados

El rango de referencia para este método en nuestro laboratorio es de **0-5 mg/L para adultos**. El ensayo presentó un CV intra- e interensayo de <5,2% y <5,1%, respectivamente.

8.6 Determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular

La VSG se determina en un microfotómetro capilar TEST-1 THL (RAL S.A., Barcelona, España). El TEST-1 THL es un analizador automático para la determinación de la VSG. Es un análisis cinético que emplea la técnica de stopped

flow (flujo interrumpido) para la medida donde los resultados se muestran en mm/h en el rango desde 2 a 120 mm/h. Este analizador realiza un mezclado de muestras programable en velocidad (60, 32 y 24 RPM) y en número de rotaciones, de 2 a 1000 rotaciones (recomendado 32 RPM, 96 rotaciones, unos 3 minutos). El primer resultado está disponible a los 3 minutos y 20 segundos. Cada 20 minutos aparece un nuevo resultado. El volumen mínimo de muestra necesario son 500 microlitros. **Se considera positivo un valor superior a 20 mm/h para mujeres y superior a 30 mm/h para hombres.** El ensayo presentó un CV intra- e interensayo de <6,6% y <6,8%, respectivamente.

8.7 Determinación de Anticuerpos Antinucleares

Los ANAs son anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares, ya sean nucleares, nucleolares o citoplasmáticos que se detectan e identifican por inmunofluorescencia indirecta sobre un sustrato antigénico de células HEp-2. La utilidad fundamental de los ANAs es diagnóstica. Presentan una sensibilidad elevada y un alto valor predictivo negativo para enfermedad autoinmune sistémica.

En **Atención Especializada** el laboratorio responde a la solicitud de ANAs con la realización simultánea de una prueba de cribado semicuantitativa de ANAs por ELISA y otra prueba mediante inmunofluorescencia indirecta. En esta última prueba se establece una dilución inicial 1:80 y se informan los títulos y patrones de inmunofluorescencia observados. La descripción de esta prueba por IFI y los algoritmos que se derivan de ella figuran en el Anexo 6.

En **Atención Especializada** se realizan asociados al cribado de ANA para obtener con ello la máxima sensibilidad. Su especificidad depende del punto de corte. En personas sanas: >1/40 (20-30%), >1:80 (10-12%), >1:160 (5%) y >1:320 (3%). En **Atención Primaria** se atenderá la solicitud por IFI cuando se justifique la misma al laboratorio.

Determinación de Anticuerpos Antinucleares por ELISA

Para la determinación de los ANAs de forma semicuantitativa en suero humano se emplea el ensayo QUANTA Lite™ ANA ELISA (INNOVA Diagnostics Inc., San Diego, USA) basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Este ensayo detecta de forma colectiva, en un solo pocillo, la cantidad total de ANAs respecto de la cromatina (ADN de doble cadena e histonas), Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centrómeros y PCNA, así como los anticuerpos respecto de antígenos citoplasmáticos importantes desde el punto de vista del diagnóstico, como Jo-1, mitocondrias M2 y proteína P ribosomal. Las muestras de suero que den positivo para antígenos indefinidos mediante el test tradicional de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2 también son detectables.

a) Procedimiento de trabajo

Los antígenos individuales altamente purificados, más los extractos de núcleos y nucléolos de HEp-2, se unen a la superficie de una placa de micropocillos. Entre los antígenos se incluyen la cromatina (ADN de doble cadena e histonas), Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centrómeros, PCNA, Jo-1, mitocondrias (M2) y proteínas P ribosomales, así como extractos nucleares y nucleolares de HEp-2 purificados.

Se añaden controles y muestras convenientemente diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los anticuerpos anti ANA al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti IgG humana a cada pocillo. Un segundo paso de incubación permite que el conjugado se una a los anticuerpos presentes. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se añade un sustrato cromogénico y tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. El ensayo puede ser evaluado fotométricamente comparando la intensidad de color en las muestras con la de los controles.

b) Procedimiento de ensayo

Al igual que ocurre para los anti-CCP, el procesamiento analítico y el cálculo de los resultados están automatizados en el autoanalizador Zenit SP+ (Menarini Diagnostics, Florence, Italy). El procedimiento del ensayo consta de los siguientes pasos:

- 1) Todos los reactivos han de estar a temperatura ambiente (20-26 °C) antes de empezar el ensayo. Poner el número necesario de tiras en el soporte.

- 2) Agregar 100 μl de los controles prediluidos ANA ELISA positivo débil, ANA ELISA positivo fuerte, ANA ELISA negativo y las muestras prediluidas en los pocillos. Cubrir los pocillos e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en una superficie plana. El tiempo de incubación empieza después de la adición de la última muestra.
- 3) Lavado: aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300 μl de solución de lavado a todos los pocillos y aspirar. Repetir esta secuencia dos veces más para un total de tres lavados. Invertir la placa y golpearla suavemente en material absorbente para eliminar cualquier fluido residual tras el último lavado. Es importante que cada pocillo esté completamente vacío después de cada paso de lavado. Mantener la misma secuencia para la aspiración que la usada para la adición de muestras.
- 4) Agregar 100 μl de conjugado anti-IgG marcado con peroxidasa de rábano a cada pocillo. El conjugado se debe tomar con una pipeta en las condiciones más asépticas posibles y siguiendo buenas técnicas de laboratorio. Aspirar solamente la cantidad de conjugado necesaria para el ensayo. Para evitar cualquier contaminación potencial microbiana y/o química, nunca devolver el conjugado sin usar a su recipiente original. Incubar los pocillos 30 minutos como en el paso 2.
- 5) Lavado: repetir el paso 3.
- 6) Agregar 100 μl de cromógeno TMB a cada pocillo e incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- 7) Agregar 100 μl de solución de parada a cada pocillo. Mantener la misma secuencia y temporalización que la efectuada en la adición de cromógeno. Agitar suavemente la placa para mezclar bien los pocillos.
- 8) Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 450 nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

9) Para considerar válidos los resultados deben considerarse satisfechos todos los criterios especificados a continuación, si alguno de ellos no se cumple la prueba debe considerarse inválida y repetirse.

- La absorbancia del control ANA positivo fuerte debe ser superior a la del control ANA positivo débil y la de este debe ser superior a la del control negativo.
- El control ANA positivo fuerte debe tener una absorbancia mayor que 1.0 mientras que la del control negativo no debe exceder de 0.15.
- La absorbancia del control ANA positivo débil debe ser superior al doble del control negativo, u oscilar entre 0.15.
- Los controles ELISA negativo y ANA positivo fuerte están pensados para monitorizar problemas de reactivo de magnitud substancial. El control ANA positivo fuerte no puede asegurar precisión alguna en el punto de corte del ensayo.

c) Cálculo de resultados semicuantitativos (método de proporciones)

La reactividad para cada muestra se calcula dividiendo la densidad óptica de la muestra por la densidad óptica del control ANA positivo débil. El valor es multiplicado por el número de las unidades del control ANA positivo débil encontrado en la etiqueta.

$$\text{Valor de la muestra (unidades)} = \frac{\text{DO muestra} \cdot \text{Valor ELISA positivo débil (unidades)}}{\text{DO ELISA positivo débil}}$$

La reactividad de la muestra está relacionada de manera no lineal con la cantidad de anticuerpo presente. Mientras que los aumentos y disminuciones en la concentración de anticuerpos del paciente se reflejarán en el aumento o disminución correspondiente de la reactividad, los cambios no son proporcionales. Si se deseara una cuantificación más precisa de la cantidad de anticuerpo, puede informarse como el título de anticuerpo de la muestra la última dilución positiva de una serie de diluciones seriadas de la muestra.

d) Interpretación de los resultados

La técnica ELISA es muy sensible y es capaz de detectar pequeñas diferencias entre poblaciones de pacientes. Los valores presentados a continuación son sólo valores sugeridos. Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en su propia metodología, controles, equipo y población de pacientes. **Se considera un resultado positivo con un valor ≥ 80 unidades mediante esta técnica.**

- Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos anti-ANA y sugiere la posibilidad de enfermedades reumáticas como AR, LES, SS, ES y EMTC.
- Un resultado negativo indica que no se ha detectado ninguno de los anticuerpos testeados o que las cantidades de dichos anticuerpos se encuentran por debajo del umbral negativo del ensayo.
- Se sugiere que el laboratorio informe del equipo empleado. Los valores obtenidos con equipos de diferentes fabricantes pueden variar y no pueden intercambiarse entre ellos.

El ensayo presentó un CV intra- e interensayo de $<7\%$ y $<11\%$, respectivamente.

9

Variables del estudio

9.1 Definición de las variables del estudio

En la Tabla 13 se recopilan la definición de las variables incluidas en el estudio especificando los sujetos a los que se les determina, el nivel de medición y la definición operativa de la misma concluyendo con la codificación de las variables cualitativas.

Variables	Sujetos	Nivel de medición	Definición operativa	Codificación
Sexo	Todos	Nominal Dicotómica	Características fenotípicas del sujeto.	0 = Masculino 1 = Femenino
Edad	Todos	Cuantitativa Discreta	Fecha de nacimiento.	No aplicable
Antecedentes familiares de AR	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Antecedentes familiares de AR en la familia del paciente.	0 = No 1 = Si
Hábito tabáquico	Todos	Nominal Dicotómica	Hábito tabáquico definido como no fumador o fumador (ex o activo).	0 = No fumador 1 = Fumador (ex fumador o fumador activo)
Hábito tabáquico	Todos	Nominal Politómica	Hábito tabáquico definido como no fumador, ex fumador o fumador activo.	0 = No fumador 1 = Ex fumador 2 = Fumador activo
Índice de tabaquismo	Todos	Cuantitativa Continua	Índice de tabaquismo definido por paquetes/año: (Nº cigarros al día x Nº años fumando)/20	No aplicable
Índice de tabaquismo	Todos	Nominal Politómica	Índice de tabaquismo definido por paquetes/año: (Nº cigarros al día x Nº años fumando)/20	0 = Negativo 1 = Bajo (1-20 paquetes/año) 2 = Alto (>20 paquetes/año)
Consumo de alcohol	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Consumo de alcohol por el paciente.	0 = No 1 = Si
Enfermedad autoinmune previa	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Coexistencia en el paciente de otra autoinmune previa a la AR.	0 = No 1 = Si
Forma de inicio de los síntomas	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Politómica	Forma de debut de la clínica del paciente	0 = Polimialgias 1 = Poliartralgias 2 = Monoarticular 3 = Oligoarticular 4 = Poliarticular
Diagnóstico precoz (≤ 2 años)	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Tiempo de diagnóstico inferior o igual a 2 años.	0 = No 1 = Si

Tiempo de diagnóstico	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta que el paciente es diagnosticado de AR por el clínico	No aplicable
Rigidez matutina positiva	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Rigidez matutina articular que dura al menos una hora.	0 = No 1 = Si
Artritis ≥3 grupos articulares	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Inflamación simultánea de al menos 3 grupos articulares en el paciente.	0 = No 1 = Si
Artritis de la mano	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Inflamación al menos de una articulación de la mano.	0 = No 1 = Si
Artritis simétrica	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Afectación simultánea del mismo grupo articular en ambos lados del cuerpo.	0 = No 1 = Si
Manifestaciones extraarticulares	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de manifestaciones extraarticulares de AR en el paciente.	0 = No 1 = Si
Nódulos reumatoides	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de nódulos subcutáneos y observados por el clínico.	0 = No 1 = Si
Número de criterios ACR (1987) ≥4	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Cumplimiento por el paciente de ≥4 criterios ACR (1987).	0 = No 1 = Si
Dolor articular nocturno	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Descripción por parte del paciente de dolores articulares nocturnos que lo despiertan del sueño.	0 = No 1 = Si
Erosiones articulares	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de erosiones articulares evidenciadas en las radiografías.	0 = No 1 = Si
HAQ ≥1	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de un HAQ ≥1 como marcador de mal pronóstico.	0 = No 1 = Si
DAS28 ≥5,5	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de un DAS28 ≥5,5 como marcador de mal pronóstico.	0 = No 1 = Si
Rigidez matutina (minutos)	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Duración de la rigidez matutina en minutos.	No aplicable
NAI (sobre 28 articulaciones)	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Discreta	Número articulaciones inflamadas en el paciente basado en recuento de 28 articulaciones. De 0 a 28.	No aplicable

NAD (sobre 28 articulaciones)	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Discreta	Número articulaciones dolorosas en el paciente basado en recuento de 28 articulaciones. De 0 a 28.	No aplicable
Número de criterios ACR (1987)	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Discreta	Número de criterios ACR (1987) que cumple el paciente. De 0 a 7 criterios.	No aplicable
Índice de función física HAQ	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Valor del índice de actividad funcional HAQ obtenido al rellenar el cuestionario HAQ. De 0 a 3.	No aplicable
Índice de actividad DAS28	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Valor del índice DAS28 basado en la VSG y que emplea 3 variables en la fórmula. De 0 a 10.	No aplicable
Evaluación global de la enfermedad por el paciente - EGP	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Evaluación global de la enfermedad desde la perspectiva del paciente (EGP). De 0 a 10 cm.	No aplicable
Evaluación global de la enfermedad por el médico - EGM	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Evaluación global de la enfermedad desde la perspectiva del médico (EGM). De 0 a 10 cm.	No aplicable
Evaluación del dolor - EVA	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Evaluación del dolor realizada por el paciente. De 0 a 10 cm.	No aplicable
Epitopo compartido	Todos	Nominal Politémica	Determinación del epitopo compartido por hibridación reversa.	0 = Negativo 1 = Positivo 2 = Heterocigoto 3 = Homocigoto
Alelos del epitopo compartido	Todos	Nominal Politémica	Determinación del epitopo compartido por hibridación reversa expresando las combinaciones alélicas obtenidas.	0 = DRB1*01-QRRRAA / Negativo 1 = DRB1*04-QKRAA / Negativo 2 = DRB1*04-QRRRAA / Negativo 3 = DRB1*01-QRRRAA / DRB1*04-QRRRAA 4 = DRB1*01-QRRRAA / DRB1*04-QKRAA 5 = DRB1*04-QKRAA / DRB1*04-QKRAA 6 = DRB1*04-QKRAA / DRB1*04-QRRRAA 7 = DRB1*04-QRRRAA / DRB1*04-QRRRAA

Genotipos del epitopo compartido	Todos	Nominal Politómica	Determinación del epitopo compartido por hibridación reversa expresado como el genotipo (DR1 o DR4) que presenta el paciente.	0 = Negativo 1 = HLA DR1 positivo 2 = HLA DR4 positivo
Anti-CCP positivo (>40 U/mL)	Todos	Nominal Dicotómica	Presencia de anti-CCP positivo definido por un punto de corte >40 U/mL.	0 = No 1 = Si
FR positivo (>20 UI/mL)	Todos	Nominal Dicotómica	Seropositividad para el FR al diagnóstico con un punto de corte >20 UI/mL.	0 = No 1 = Si
Anti-CCP y FR positivos	Todos	Nominal Dicotómica	Presencia de anti-CCP y FR positivos.	0 = No 1 = Si
PCR elevada (>5 mg/L)	Todos	Nominal Dicotómica	Presencia de PCR elevada con un valor superior a 5 mg/L.	0 = No 1 = Si
VSG elevada (>30 mm/h en hombres y >20 mm/h en mujeres)	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Presencia de VSG elevada con una valor superior a 30 mm/h en hombres y >20 mm/h en mujeres.	0 = No 1 = Si
ANA positivo ($\geq 1/80$)	Grupo AR Grupo NOAR	Nominal Dicotómica	Detección de anticuerpos antinucleares positivos por IFI al diagnóstico a título $\geq 1/80$.	0 = No 1 = Si
Anti-CCP (U/mL)	Todos	Cuantitativa Continua	Concentración de anti-CCP por el método ELISA.	No aplicable
FR (UI/mL)	Todos	Cuantitativa Continua	Concentración de FR medido por método inmunoturbidimétrico.	No aplicable
PCR (mg/L)	Todos	Cuantitativa Continua	Concentración de PCR medido por método inmunoturbidimétrico.	No aplicable
VSG (mm/h)	Grupo AR Grupo NOAR	Cuantitativa Continua	Determinación de la VSG por análisis cinético	No aplicable
Tratamiento	Grupo AR	Nominal Politómica	Tipo de tratamiento que recibe el paciente.	0 = Corticoides 1 = FARMES 2 = Terapia Biológica

Tabla 13. Definición de las variables incluidas en el estudio.

9.2 Planificación de las variables durante el estudio

Variables	Basal	Primer año	Segundo año	Tercer año
Sexo	X			
Edad	X			
Antecedentes familiares de AR	X			
Hábito tabáquico	X			
Índice de tabaquismo	X			
Consumo de alcohol	X			
Enfermedad autoinmune previa	X			
Tiempo de diagnóstico	X			
Diagnóstico precoz (≤ 2 años)	X			
Forma de inicio de los síntomas	X			
Rigidez matutina positiva	X	X	X	X
Artritis ≥ 3 grupos articulares	X	X	X	X
Artritis de la mano	X	X	X	X
Artritis simétrica	X	X	X	X
Manifestaciones extraarticulares	X	X	X	X
Nódulos reumatoides	X	X	X	X
Número de criterios ACR (1987) ≥ 4	X			
Dolor articular nocturno	X	X	X	X
Erosiones articulares	X	X	X	X
HAQ ≥ 1	X			
DAS28 $\geq 5,5$	X			
Rigidez matutina (minutos)	X	X	X	X
NAI (sobre 28 articulaciones)	X	X	X	X
NAD (sobre 28 articulaciones)	X	X	X	X
Número de criterios ACR (1987)	X			
Índice de función física HAQ	X	X	X	X
Índice de actividad DAS28	X	X	X	X
EGP (cm)	X	X	X	X
EVA (cm)	X	X	X	X
EGM (cm)	X	X	X	X
Epitopo compartido positivo	X			
Alelos del epitopo compartido	X			
Genotipos del epitopo compartido	X			
Anti-CCP positivo (>40 U/mL)	X			
FR positivo (>20 UI/mL)	X			
Anti-CCP y FR positivos	X			
PCR elevada (>5 mg/L)	X			
VSG elevada (>30 mm/h en hombres y >20 mm/h en mujeres)	X			
ANA positivo ($\geq 1/80$)	X			
Anti-CCP (U/mL)	X			
FR (UI/mL)	X			
PCR (mg/L)	X	X	X	X
VSG (mm/h)	X	X	X	X
Tratamiento	X	X	X	X

Tabla 14. Planificación de las variables incluidas en el estudio.

En la tabla 14 se encuentra la planificación de las variables incluidas en el estudio. Las variables en el estado basal o año cero se han determinado a los grupos según consta en la tabla anterior de definición de las variables. Las variables al primer, segundo y tercer año se han medido sólo para los pacientes pertenecientes al grupo AR.

10

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos, se diseñó una base de datos en el Editor del software SPSS para Windows versión 19 (Chicago, Illinois, USA) para almacenar los datos. El análisis estadístico se realizó con el mismo programa. La metodología estadística estuvo formada por una parte descriptiva y otra analítica.

- **Estadística descriptiva**

El estudio descriptivo de las variables demográficas, clínicas y bioquímicas de los sujetos se llevó a cabo mediante el cálculo de estadísticos descriptivos básicos. Las variables cualitativas, tanto nominales (categóricas) como ordinales, fueron descritas mediante frecuencias absolutas y porcentajes de cada una de las categorías, en los casos necesarios se realizaron gráficos de distribución de frecuencias (histogramas). Las variables cuantitativas continuas fueron descritas con el valor de la mediana (Me) como medida de tendencia central y el rango intercuartílico (IQR) como medida de dispersión: Me (IQR). No obstante, se calcularon medias, valores máximo, mínimo, rango y la desviación estándar.

- **Estadística analítica bivalente**

En el estudio analítico, la comparación entre las distintas variables se llevó a cabo dependiendo de la naturaleza entre las variables implicadas. Para relacionar una variable cualitativa con otra variable cualitativa, se construyeron tablas de contingencia 2x2 y se empleó el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates o el test exacto de Fisher en tablas 2x2 cuando fuera necesario (si las frecuencias esperadas eran <5% en más de un 20% de las casillas).

Para las variables cuantitativas, en primer lugar se comprobó la normalidad en su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicándose pruebas no paramétricas en aquellos casos en los que la variable no cumplía condiciones de normalidad. Para comparar una variable cuantitativa con una variable cualitativa se usaron los tests no paramétricos de la U de Mann-Whitney y de Krustal-Wallis si la variable cualitativa presentaba dos o más categorías respectivamente. En el caso de variables continuas y/o distribución normal se emplearon pruebas paramétricas (t de student y análisis de varianza o ANOVA).

- **Rendimiento diagnóstico de los marcadores bioquímicos**

El estudio del rendimiento diagnóstico de los marcadores bioquímicos se evaluó mediante las medidas de validez: S, E, VPP, VPN, LR+ y LR-. Se construyeron curvas ROC que relacionaron la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) con la fracción de falsos positivos (1-especificidad) para cada uno de los marcadores bioquímicos y las combinaciones empleadas de los mismos. La significación de dichas curvas se evaluó a partir del área bajo la curva y del cálculo de los correspondientes IC95%. La mayor exactitud de una prueba diagnóstica se traduce en un desplazamiento de la curva hacia “la izquierda y arriba”. Se realizaron comparaciones entre las distintas curvas ROC mediante el software Medcalc 12.0 que empleó la metodología descrita por DeLong y colaboradores⁴⁴⁴. Para la evaluación de la utilidad clínica de los marcadores bioquímicos o biomarcadores en el diagnóstico de la AR en pacientes con sospecha se decidió realizar dos estudios:

- a) En primer lugar, se estudió el rendimiento diagnóstico sobre el grupo de los pacientes diagnosticados de AR (**grupo AR**) tomando como referencia o control el grupo definido por la combinación de los **grupos NOAR y CONTROL** siendo representativo de la situación que se presenta en una **consulta de Atención Primaria**.
- b) En segundo lugar, se repitió el estudio entre el **grupo AR** y tomando como referencia **sólo el grupo NOAR** lo que correspondería a la situación de una **consulta especializada de Artritis Precoz**.

- **Efecto del EC y hábito tabáquico sobre los anticuerpos**

En los 106 pacientes diagnosticados de AR se estudió el efecto del EC y del hábito tabáquico sobre la presencia (variables cualitativas) y los niveles (variables cuantitativas) de los anticuerpos anti-CCP y FR:

- a) **Presencia de los anticuerpos anti-CCP y FR en pacientes con AR:** se estudió mediante un análisis bivalente usando tablas de contingencia y aplicando el test de Chi cuadrado. Se aplicó la corrección de Yates y el test exacto de Fisher si fuese necesario. Se obtuvieron los correspondientes OR con sus intervalos de confianza al 95%.
- b) **Niveles de los anticuerpos anti-CCP y FR en pacientes con AR:** se estudió mediante los test no paramétricos de la U de Mann-Whitney y de Krustal-Wallis según corresponda. El contraste a posteriori de Games-Howell se empleó cuando fue necesario para identificar entre que grupos existen diferencias significativas. La prueba no paramétrica U de Mann-Whitney se empleó para comparar los niveles de anticuerpos en las variables categóricas de dos niveles. La prueba no paramétrica de Krustal-Wallis se usó para comparar los niveles de anticuerpos entre los grupos de variables categóricas de tres niveles o más.

Con la finalidad de estudiar los factores independientes que influyen sobre la presencia y los niveles de los anticuerpos se han empleado dos **modelos de análisis multivariantes** en el estudio de las variables predictoras independientes. Para ello, las variables que mostraron una asociación estadística significativa ($p < 0,05$) o clínicamente relevante con un nivel de significación a lo sumo de $p = 0,2$ se estudiaron mediante los correspondientes modelos multivariantes.

En el primero de ellos, se realizó un análisis de **Regresión Logística Multivariante** donde se estudió el efecto del hábito tabáquico y el EC así como su posible interacción sobre la presencia de los anticuerpos anti-CCP y FR. El método utilizado fue “paso hacia atrás”. Las covariables introducidas en el modelo fueron las que mostraron una asociación estadística significativa o fueron clínicamente relevantes en el análisis bivalente. Como factores de confusión se emplearon las variables sexo

y edad. Las variables categóricas estudiadas fueron el EC, hábito tabáquico, índice tabáquico y las interacciones entre ellas.

Como medida de asociación, para la interpretación de los resultados y valoración de la magnitud de la asociación, se tomó como referencia la OR con su intervalo de confianza al 95%.

El segundo análisis multivariante consistió en un **Modelo Lineal General Univariante** basado en el ANOVA de dos factores. Con este modelo se estudió el efecto del hábito tabáquico, el índice de tabaquismo y el EC así como su interacción sobre los niveles séricos de los anticuerpos anti-CCP y FR. Estos modelos factoriales de análisis de la varianza sirven para evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores (variables independientes categóricas) sobre una variable dependiente cuantitativa. Los criterios de selección de covariables fueron los mismos que para la regresión logística binaria. Al igual que en el caso anterior utilizó las variables sexo y edad como factores de confusión siendo las variables estudiadas en el modelo el EC, el hábito tabáquico, el índice de tabaquismo y la interacción entre ambos.

La significación estadística se complementa con el coeficiente Eta^2 que estima la significación práctica. Este coeficiente es un índice de la proporción de la varianza explicada por cada factor sobre la variable dependiente. Según el criterio de Cohen, el factor asociado tiene relevancia clínica cuando este coeficiente es superior al 10%.

Al aplicar el Modelo Lineal General Univariante basado en el ANOVA, las variables cuantitativas anti-CCP y FR que seguían una distribución no paramétrica tuvieron que ser normalizadas mediante una transformación de variables denominada “normal scores transformation” (NSC). Para ambos casos de modelos multivariantes; se realizaron varios modelos y se eligió aquel que presentara un mayor R^2 y que tuviera sentido clínico, es decir, que fuese significativo desde un punto de vista estadístico y clínico.

- **Estudio del valor pronóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes diagnosticados de AR**

De los **106 pacientes con AR** incluidos en el estudio se realizó el seguimiento de los mismos durante un periodo de 3 años (Figura 28). A los 3 años de seguimiento, los datos completos sólo estaban disponibles para **59 pacientes**; los cuales

constituyeron el grupo de pacientes para el estudio pronóstico. Los 47 pacientes restantes no se incluyeron en el estudio pronóstico a 3 años debido a algunas de las siguientes causas: pérdidas de algunos pacientes durante el seguimiento, tiempo de seguimiento inferior a 3 años o ausencia de datos esenciales (DAS28, HAQ y erosiones articulares) en alguno de los puntos de seguimiento. No obstante, tanto los pacientes incluidos en el estudio pronóstico (n=59) como los excluidos (n=47) constituyeron un grupo homogéneo al diagnóstico sin encontrarse diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en cuanto a las variables demográficas, clínicas y bioquímicas de los mismos.

De este modo, el valor pronóstico de los marcadores bioquímicos anti-CCP, FR y EC en la visita basal se estudió frente a las variables de desenlace DAS28, HAQ y erosiones articulares durante el seguimiento en la visita basal, a los 12 meses, 24 meses y 36 meses de los 59 pacientes incluidos en el estudio pronóstico.

El test de Chi cuadrado se empleó para la comparación entre proporciones mientras que el test de la U de Mann-Whitney se empleó para comparar niveles en los diferentes grupos en la visita basal. El test de Wilcoxon se usó para evaluar los cambios en los parámetros DAS28 y HAQ durante el seguimiento a lo largo del tiempo mientras que para estudiar las diferencias entre grupos a lo largo del seguimiento se empleó el test de la U de Mann-Whitney.

Los nuevos criterios para la clasificación de la AR del año 2010¹⁷ introdujeron una ponderación para los anticuerpos FR y anti-CCP según se encuentren positivos a títulos bajos (<3VN) y a títulos altos (>3VN). Por ello, a la hora de determinar el valor pronóstico se dividirán los pacientes en dos grupos según la positividad para los anticuerpos a títulos positivos bajos (40 U/mL para anti-CCP y 20 UI/mL para FR) y a títulos altos (120 U/mL para anti-CCP y 60 UI/mL para FR). En los resultados se muestran el estudio para los puntos de corte de 120 U/mL para anti-CCP y 60 UI/mL para FR. Los resultados para los puntos de corte de 40 U/mL para anti-CCP y 20 UI/mL para FR se encuentran tabulados y con las gráficas correspondientes en el Anexo 7.

En todos los contrastes de hipótesis realizados con técnicas estadísticas, se ha aceptado la existencia de significación estadística para una confianza superior al 95% admitiendo un valor aleatorio inferior al 5% ($p < 0,05$).

- **Cálculo del tamaño de muestra**

Para la hipótesis 1 (análisis de la utilidad diagnóstica) se decidió incluir a todos los pacientes que se atendieran en la unidad con diagnóstico confirmado por el reumatólogo de cualquier tipo de artritis y elegir a todos aquellos que durante el primer año de seguimiento se confirmara el diagnóstico de AR. Como grupo de comparación sin artritis se seleccionaron todos aquellos pacientes que acudieron a la consulta con artritis durante el mismo periodo a quienes se les diagnosticaron otras enfermedades reumáticas distintas a la AR (grupo **NOAR**), además de los controles sanos (grupo **CONTROL**). Se decidió calcular el poder estadístico de las estimaciones a posteriori.

Para los análisis multivariantes, siguiendo un abordaje estadístico basado en recomendaciones, se decidió seleccionar siete pacientes por cada una de las variables independientes incluidas en el modelo.

11 **Plan de trabajo y cronograma**

Este estudio se realizó durante un periodo de 4 años donde el trabajo que se realizó en cada año se detalla a continuación.

a) Primer año

- Diseño del proyecto
- Revisión de la literatura
- Diseño de objetivos, hipótesis y variables del estudio
- Diseño y selección de la muestra
- Selección de los pacientes que cumplen criterios de inclusión.
- Petición de las historias clínicas a la Unidad de Archivo del Hospital y recogidas de las variables demográficas, clínicas y de laboratorio de dichos pacientes.
- Recopilación de las variables en una base de datos.

b) Segundo año

- Petición de las historias clínicas a la Unidad de Archivo del Hospital y recogidas de las variables demográficas, clínicas y de laboratorio de dichos pacientes.
- Recopilación de las variables en la base de datos.
- Revisión de la base de datos, corrección de errores y completar los datos que faltan.

c) Tercer y cuarto año

- Revisión de las últimas novedades en la literatura
- Tratamiento estadístico de los datos y obtención de resultados.
- Escritura de la tesis doctoral.

FASES DEL ESTUDIO	AÑO			
	1º	2º	3º	4º
Diseño del proyecto	■			
Revisión de la literatura	■			■
Diseño de objetivos, hipótesis y variables del estudio.	■			
Selección de los pacientes y controles que cumplen criterios de inclusión.	■			
Recogidas de variables demográficas, clínicas y de laboratorio en la base de datos.	■	■		
Revisión de la base de datos, corrección de errores y completar datos que faltan		■		
Tratamiento estadístico de datos y obtención de resultados.			■	■
Escritura de la tesis doctoral.			■	■

Tabla 15. Cronograma de trabajo



IV

Resultados

1

Características demográficas

La población inicial de estudio abarcó 211 pacientes consecutivos que mostraron síntomas de artritis de inicio y acudieron a la Consulta Especializada de Artritis Precoz. De ellos, 106 pacientes fueron diagnosticados de AR (**grupo AR**) según el juicio clínico del reumatólogo y apoyado en los criterios de clasificación de la ACR 1987. La prevalencia de AR en dicha consulta fue del 50% (IC95% 43-57).

Los 105 pacientes restantes (**grupo NOAR**) fueron diagnosticados de otras enfermedades reumáticas según los criterios vigentes: 61 pacientes con AI (29% del total de pacientes), 32 con AT (15%), 4 con PSA (2%), 3 con EA (1,5%), 3 con EITC (1,5%), 1 con LES (0,5%) y 1 con AC (0,5%). El **grupo CONTROL** estuvo formado por 65 sujetos sanos sin patología reumática. El número total de sujetos estudiados ascendió a 276 individuos con la suma de estos tres grupos: AR (38%), NOAR (38%) y CONTROL (24%).

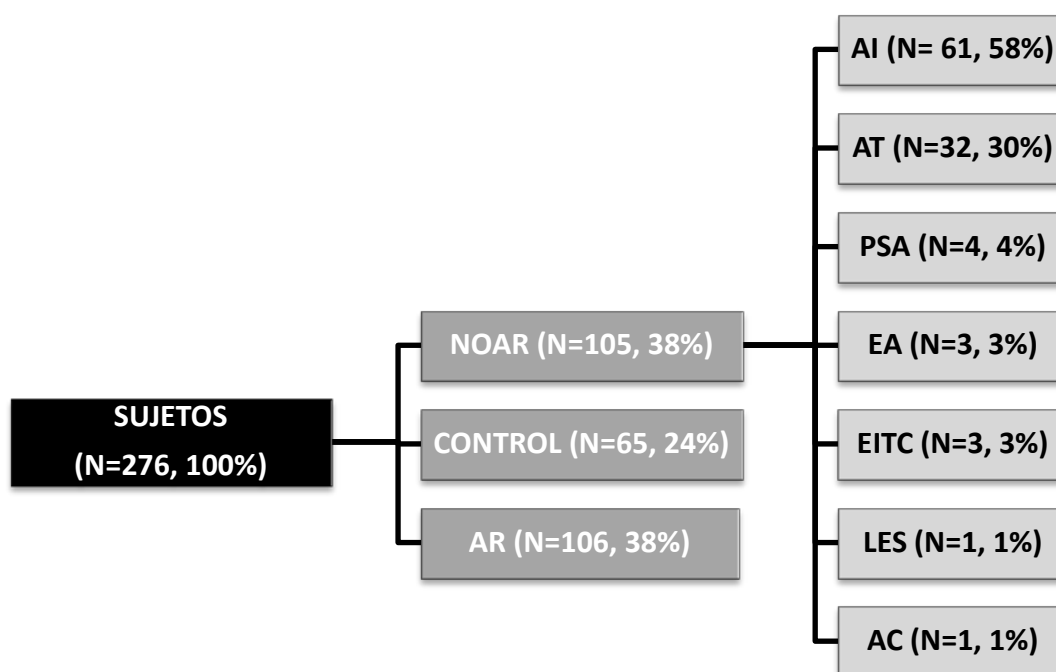


Figura 31. Clasificación de los sujetos incluidos en el estudio. Para el grupo NOAR los porcentajes hacen referencia al número de pacientes con respecto al grupo NOAR (N=65) y no con respecto al total de sujetos estudiados (N=276).

Las características demográficas de los sujetos estudiados se resumen en la Tabla 16. De ellos, 209 (76%) fueron mujeres; 76 (72%) en el grupo AR, 83 (79%) en el grupo NOAR y 50 (76%) en el grupo CONTROL. Se observó un predominio de la enfermedad (relación 3:1) en el sexo femenino respecto al masculino. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AR y NOAR en cuanto al género, antecedentes familiares de AR y consumo de alcohol.

La mediana de edad de los pacientes diagnosticados de AR fue de 53 años. Sin embargo, en el grupo NOAR se observó que la presentación de enfermedad fue significativamente más temprana.

Parámetros	AR (n=106) n (%)	NOAR (n=105) n (%)	CONTROL (n=65) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género Femenino	76 (72)	83 (79)	50 (76)	0,5
Antecedentes familiares de AR	22 (21)	18 (17)	-	0,7
Hábito tabáquico				0,1
No fumador	68 (64)	74 (70)	35 (54)	
Fumador (ex o activo)	38 (36)	31 (30)	30 (46)	
Hábito tabáquico				0,2
No fumador	68 (64)	74 (70)	35 (54)	
Ex fumador	13 (12)	11 (11)	7 (11)	
Fumador activo	25 (24)	20 (19)	23 (35)	
Índice de tabaquismo				< 0,0001
Negativo	68 (65)	75 (71)	38 (59)	
Bajo (1-20 paquetes/año)	12 (10)	22 (21)	22 (33)	
Alto (>20 paquetes/año)	26 (25)	8 (8)	5 (8)	
Consumo de alcohol	32 (30)	26 (25)	-	0,4
Enfermedad autoinmune previa	11 (10)	3 (3)	-	0,02
Diagnóstico precoz (\leq 2 años)	83 (83)	83 (87)	-	0,3
Forma inicio de los síntomas				< 0,0001
Poliarticular	70 (69)	40 (41)	-	
Oligoarticular	21 (21)	23 (24)	-	
Monoarticular	8 (8)	9 (9)	-	
Poliartralgias	2 (2)	20 (21)	-	
Polimialgias	0	5 (5)	-	
Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad (años)	53 (45-62)	49 (36-56)	49 (41-60)	0,01
Índice de tabaquismo (paquetes/año)	30 (18-45)	6 (3-21)	9 (5-20)	< 0,0001

Tabla 16. Características demográficas de los pacientes en la visita basal. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado entre los grupos AR, NOAR y CONTROL. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis entre los grupos AR, NOAR y CONTROL.

Entre los tres grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación al hábito tabáquico (no fumador vs. fumador). La prevalencia de fumadores fue ligeramente superior en el grupo AR (36%) en relación al grupo NOAR (30%) pero inferior al grupo CONTROL (46%). Al estratificar el hábito tabáquico como “no fumador”, “ex fumador” y “fumador activo” no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el índice de tabaquismo entre el grupo AR y los grupos NOAR y CONTROL. Así, el 25% de los pacientes con AR presentaron un IT de gran fumador (>20 paquetes/año) mientras que en los otros dos grupos este porcentaje fue del 8% en ambos casos.

Para el índice de tabaquismo se observó una mediana de 30 paquetes/año en el grupo AR mientras que para los grupos NOAR y CONTROL disminuyó a 6 y 9 paquetes/año, respectivamente (Tabla 16). En los sujetos fumadores de cada uno de los tres grupos estudiados, el índice de tabaquismo se estratificó según el hábito tabáquico, es decir, según los individuos sean “fumadores activos” o “ex fumadores” (Tabla 17).

Hábito Tabáquico	Índice de Tabaquismo (paquetes/año)		
	AR (n=38) Me (IQR)	NOAR (n=31) Me (IQR)	CONTROL (n=30) Me (IQR)
Ex fumador	45 (36-56)	4 (1-17)	5 (3-10)
Fumador activo	26 (18-31)	7 (4-29)	10 (5-20)
Valor p ⁽¹⁾	0,008	0,2	0,3

Tabla 17. Índice de tabaquismo en los sujetos fumadores de cada grupo estudiado (AR, NOAR y CONTROL) según el hábito tabáquico (“ex fumador” y “fumador activo”). ⁽¹⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney entre los grupos “ex fumador” “fumador activo” para cada una de las categorías de sujetos.

En el grupo AR se observó que el índice de tabaquismo fue superior en los “ex fumadores” frente a “fumadores activos” con valores de 45 y 26 paquetes/año, respectivamente (Tabla 17, figura 32). Por el contrario, en los grupos NOAR y CONTROL el índice de tabaquismo fue superior en los “fumadores activos” pero las diferencias no fueron significativas entre los dos grupos definidos por el hábito tabáquico.

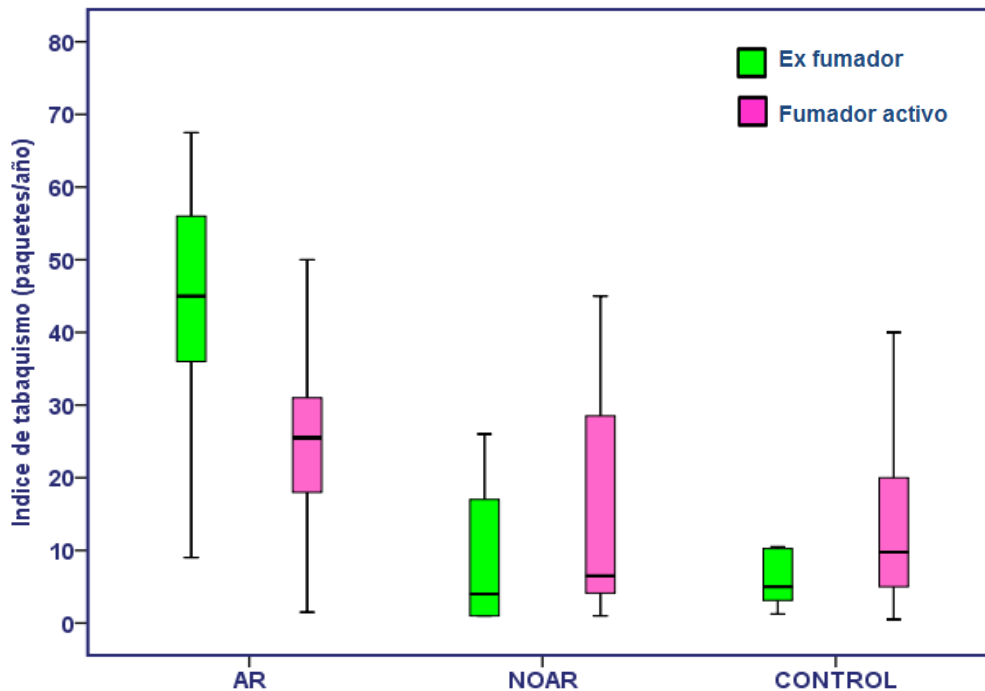


Figura 32. Índice de tabaquismo en los sujetos fumadores de cada grupo estudiado (AR, NOAR y CONTROL) según el hábito tabáquico (“ex fumador” y “fumador activo”).

En cuanto a la coexistencia en el paciente de una enfermedad autoinmune previa, se observó un mayor porcentaje en el grupo AR (10%) en relación al grupo NOAR (3%) siendo estadísticamente significativo. Las enfermedades autoinmunes presentes en el grupo AR fueron 6 casos con HA, 2 con HA más SS, 2 hipertiroidismos autoinmunes y 1 LES. En el grupo NOAR todos los pacientes con enfermedad autoinmune previa fueron diagnosticados de AI y las patologías autoinmunes previas asociadas fueron 3 casos con HA.

Al inicio del estudio, en la mayoría del grupo AR (83%) el diagnóstico de la enfermedad fue precoz, con un tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas hasta el diagnóstico inferior o igual a dos años. Un bajo porcentaje del grupo AR (17%) en la consulta inicial estuvo constituido por pacientes con una enfermedad evolucionada y activa. El debut clínico de la enfermedad en los pacientes del grupo AR fue de predominio poliarticular (69%) mientras que en el grupo NOAR fue diverso con predominio de formas poliarticular (41%), poliartralgias (24%) y polimialgias (21%). Sin embargo, en el grupo NOAR, sólo se observó una asociación estadísticamente significativa con las formas de inicio de tipo poliartralgias y polimialgias.

2

Descripción de variables clínicas

En la Tabla 18 se resumen las características clínicas de los pacientes en su primera visita a la Consulta Especializada de Artritis Precoz. El cumplimiento de los criterios de clasificación de AR del ACR (1987) es significativamente mayor en el grupo AR que en el grupo NOAR. Así, la rigidez matutina, presencia de artritis de 3 ó más grupos articulares, artritis de las articulaciones de la mano, artritis simétrica, nódulos reumatoides y erosiones articulares predominaron en el grupo AR frente al grupo NOAR. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con dolor nocturno en ambos grupos.

Parámetros	AR (n=106) n (%)	NOAR (n=105) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Rigidez matutina positiva	53 (50)	24 (23)	<0,0001
Artritis ≥3 grupos articulares	88 (84)	43 (41)	<0,0001
Artritis mano	95 (90)	59 (57)	<0,0001
Artritis simétrica	80 (76)	39 (38)	<0,0001
Manifestaciones extraarticulares	22 (21)	9 (9)	0,01
Nódulos reumatoides	7 (7)	0	0,007
Criterios ACR (1987) ≥4	82 (78)	27 (26)	<0,0001
Dolor articular nocturno	43 (41)	34 (35)	0,4
Erosiones articulares	64 (60)	24 (23)	<0,0001
HAQ ≥1	55 (66)	24 (39)	0,002
DAS28 ≥5,5	53 (51)	22 (21)	<0,0001
Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Rigidez matutina (minutos)	45 (0-120)	0 (0-30)	<0,0001
NAI (sobre 28 articulaciones)	10 (4-15)	2 (0-10)	<0,0001
NAD (sobre 28 articulaciones)	10 (3-17)	2 (0-10)	<0,0001
Nº criterios ACR (1987)	5 (4-6)	2 (1-4)	<0,0001
HAQ	1,3 (0,5-2)	0,1 (0-1,6)	<0,0001
DAS28	5,2 (3,7-6,4)	3,1 (2,2-4,9)	<0,0001
EVA (cm)	6 (3,9-8)	7 (3,5-8,1)	0,7
EGP (cm)	5 (3-7)	3 (1-7,2)	0,008
EGM (cm)	5 (4-7)	4 (2-6)	0,04

Tabla 18. Características clínicas de los pacientes en la visita basal. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado entre los grupos AR y NOAR. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney entre los grupos AR y NOAR.

Las manifestaciones extraarticulares estaban presentes en el 21% de los pacientes AR frente al 9% del grupo NOAR (Figura 33). Los nódulos reumatoides, característicos de una enfermedad avanzada se encontraron en el 6% de los pacientes del grupo AR y estuvieron ausentes en el grupo NOAR. La presencia de marcadores de mal pronóstico como un HAQ>1 ó DAS28≥5,5 fue significativamente mayor en el grupo AR frente al grupo NOAR. En ambos grupos, los pacientes manifestaron que experimentaron rigidez matutina en el 50% de los casos del grupo AR y en el 23% de los casos en grupo NOAR. La duración de la rigidez matutina fue de 45 (0-120) minutos en el grupo AR.

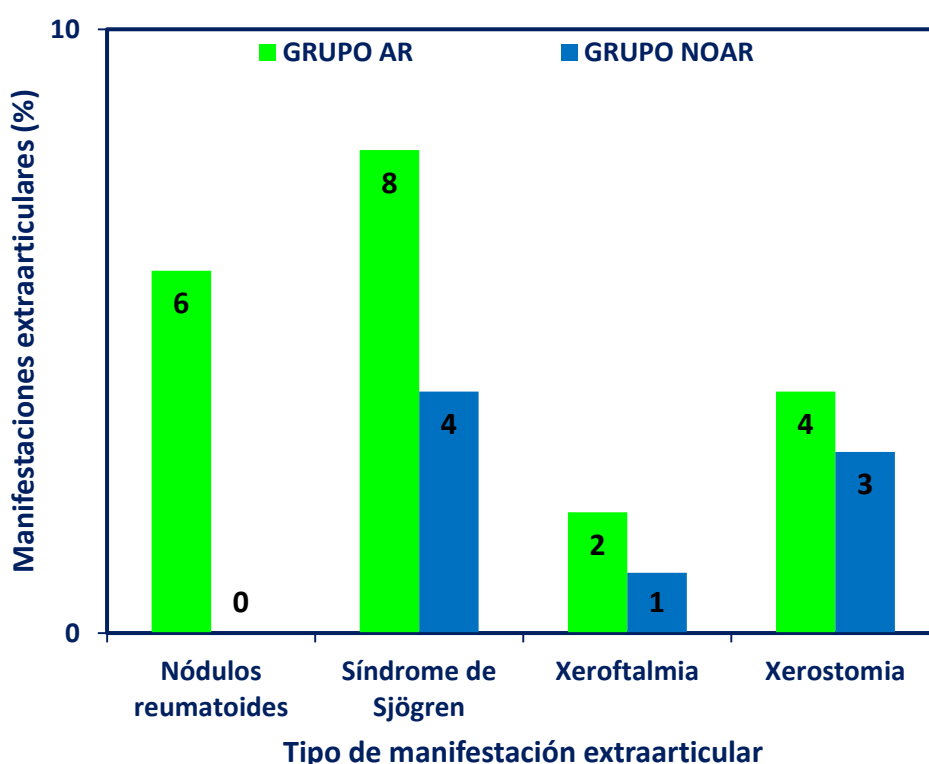


Figura 33. Manifestaciones extraarticulares presentes en los pacientes en la visita basal.

El índice compuesto de actividad DAS28 y el índice de función física HAQ de la enfermedad fueron significativamente más elevados, y por lo tanto representativos de un peor pronóstico, en los pacientes del grupo AR frente al grupo NOAR. La mediana del DAS28 fue de 5,2 (3,7-6,4) y de 3,1 (2,2-4,9), respectivamente. La puntuación HAQ fue de 1,3 (0,5-2) en el grupo AR y de 0,1 (0-1,6) en el grupo NOAR. Del mismo modo; los recuentos de articulaciones dolorosas e inflamadas (NAD y NAI respectivamente) fueron significativamente mayores en el grupo AR.

Los pacientes del grupo AR presentaron a la entrada en el estudio una actividad alta de la enfermedad (DAS28 de 5,2) con un deterioro de la integridad estructural articular (60% de pacientes con erosiones en la visita inicial) y que condiciona una importante pérdida de la capacidad funcional (HAQ de 1,3) y de la calidad de vida.

3 Descripción de variables bioquímicas

Las variables bioquímicas (anti-CCP, FR, PCR, VSG, ANA y EC) para cada uno de los grupos estudiados se resumen en la Tabla 19. Los anti-CCP fueron positivos en 69 de los 106 pacientes del grupo AR siendo su prevalencia del 65% y en 4 de los 105 pacientes del grupo NOAR con una prevalencia del 4%. Los anti-CCP positivos no se detectaron en el grupo CONTROL. En el grupo NOAR, el diagnóstico de los cuatro pacientes con anti-CCP positivos fue de AI que durante su seguimiento evolucionaron a AR.

El FR fue positivo en 86 de los 106 pacientes del grupo AR con una prevalencia del 81%. La prevalencia del FR en los grupos NOAR (25 de 105 pacientes) y CONTROL (7 de 65 sujetos) fue del 24% y 10% respectivamente. Los diagnósticos de los pacientes con FR positivo en el grupo NOAR correspondieron a 15 AI, 8 AT, 1 PSA y 1 EITC. De los sujetos estudiados, un 60% presentaron positividad concomitante para los anti-CCP y FR en el grupo AR. En el grupo NOAR se redujo a un 4% que corresponde a la positividad de los anticuerpos anti-CCP en dicho grupo mientras que en el grupo CONTROL no se presentó la positividad simultánea de ambos anticuerpos ($p < 0,0001$).

Los niveles de los reactantes de fase aguda PCR y VSG fueron mayores en el grupo AR en relación a los otros dos grupos (NOAR y CONTROL) con diferencias estadísticamente significativas para ambos parámetros. Setenta y seis pacientes presentaron cifras elevadas de PCR en el grupo AR con una prevalencia del 72%. En los grupos NOAR y CONTROL estuvo elevada en 55 (53%) y 14 (21%) pacientes, respectivamente. Treinta y seis pacientes (34%) presentaron cifras de VSG elevadas en el grupo AR mientras que para el grupo NOAR ocurrió en 14 pacientes (13%).

Parámetros	AR (n=106) n (%)	NOAR (n=105) n (%)	CONTROL (n=65) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Anti-CCP positivo (>40 U/mL)	69 (65)	4 (4)	0	<0,0001
FR positivo (>20 UI/mL)	86 (81)	25 (24)	7 (10)	<0,0001
Anti-CCP y FR positivos	64 (60)	4 (4)	0	<0,0001
PCR elevada	76 (72)	55 (53)	14 (21)	<0,0001
VSG elevada	36 (34)	14 (13)	-	<0,0001
ANA positivo (≥1/80)	22 (29)	13 (15)	-	0,02
Epitopo compartido positivo	77 (73)	65 (62)	17 (26)	<0,0001
Heterocigoto	60 (57)	60 (57)	17 (26)	
Heterocigoto DR1	27 (26)	37 (35)	11 (17)	
Heterocigoto DR4	33 (31)	23 (22)	6 (9)	
Homocigoto	17 (16)	5 (5)	0	
Alelos del epitopo compartido				<0,0001
DRB1*01-QRRAA / Negativo	27 (25)	37 (35)	11 (17)	
DRB1*04-QKRAA / Negativo	12 (11)	5 (5)	0	
DRB1*04-QRRAA / Negativo	21 (20)	18 (17)	6 (9)	
DRB1*01-QRRAA / DRB1*04-QRRAA	1 (1)	5 (5)	0	
DRB1*01-QRRAA / DRB1*04-QKRAA	6 (6)	0	0	
DRB1*04-QKRAA / DRB1*04-QKRAA	2 (2)	0	0	
DRB1*04-QKRAA / DRB1*04-QRRAA	5 (5)	0	0	
DRB1*04-QRRAA / DRB1*04-QRRAA	3 (3)	0	0	
Genotipos del epitopo compartido				<0,0001
Negativo	29 (27)	40 (38)	48 (74)	
Positivo DR1	27 (26)	37 (35)	11 (17)	
Positivo DR4	43 (40)	23 (22)	6 (9)	
Positivo DR1 / DR4	7 (7)	5 (5)	0	
Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Anti-CCP (U/mL)	133 (11-280)	3,2 (1,4-8)	2,8 (1,6-5,6)	<0,0001
FR (UI/mL)	61,8 (31-178)	17 (11-20)	12 (10-14)	<0,0001
PCR (mg/L)	11,2 (3,9-30,5)	5,9 (1,5-12,8)	0,9 (0,4-4,6)	<0,0001
VSG (mm/h)	20 (10-40)	10 (5-21)	-	<0,0001

Tabla 19. Variables bioquímicas de los pacientes en la visita basal. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado entre los grupos AR, NOAR y CONTROL. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis entre los grupos AR, NOAR y CONTROL.

Los ANAs, dirigidos contra antígenos contenidos en el núcleo celular, fueron positivos en 22 pacientes (29%) del grupo AR y estuvieron presentes en 13 pacientes (15%) del grupo NOAR: 6 pacientes con AI, 2 con AT, 1 con PSA, 3 con EITC y 1 con LES. En la figura 34 se encuentran los patrones por IFI obtenidos en los pacientes con ANAs positivos.

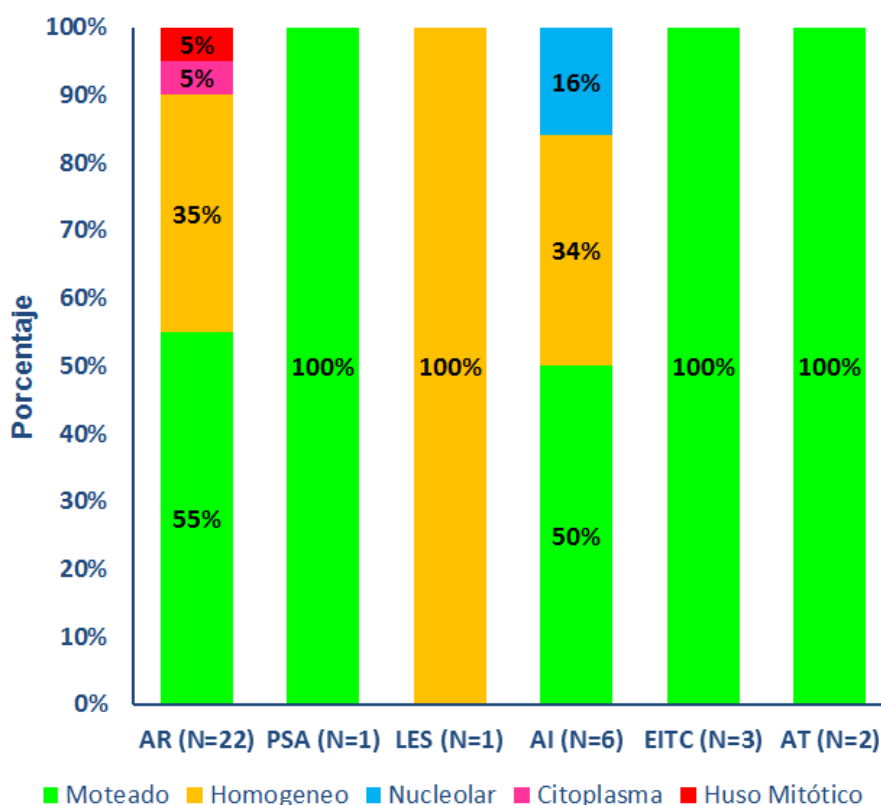


Figura 34. Patrones por IFI observados en los pacientes con ANAs positivos.

El patrón moteado fue el patrón más frecuente tanto en los pacientes AR como en los pacientes NOAR. Dentro de los pacientes con AR y que presentaron el patrón moteado por IFI, tres de ellos presentaron asociados un SS. Una paciente con AR y patrón homogéneo a título 1/320 por IFI presentó un solapamiento AR y LES que se conoce como “*rhupus*” y presentó una combinación de características clínicas típicas de AR y de LES.

Para los valores cuantitativos de las variables bioquímicas anti-CCP, FR, PCR y VSG se observaron diferencias estadísticamente significativas siendo éstas variables más elevadas en el grupo AR en relación a los otros dos grupos. Así, valores significativamente más elevados de anti-CCP se encontraron en el grupo AR frente a los grupos NOAR y CONTROL (133 vs. 3,2 vs. 2,8 U/mL respectivamente, $p < 0,0001$). De manera similar, se encontraron mayores concentraciones para el FR en el grupo AR frente a los grupos NOAR y CONTROL (61,8 vs. 17 vs. 12 UI/mL respectivamente, $p < 0,0001$) y para la PCR (11,2 vs. 5,9 vs. 0,9 mg/L respectivamente, $p < 0,0001$). Para la VSG, las medianas de concentraciones fueron de 20 mm/h para el grupo AR y de 10 mm/h para el grupo NOAR ($p < 0,0001$).

La positividad para el EC, secuencia génica ampliamente relacionada con la fisiopatología de la AR, presentó una mayor prevalencia en el grupo AR comparado con los grupos NOAR y CONTROL ($p < 0,0001$). La prevalencia del EC fue del 73% (77 pacientes), 62% (65 pacientes) y 26% (17 individuos) en los grupos AR, NOAR y CONTROL, respectivamente. La presencia del EC positivo se relacionó con el diagnóstico de AR mientras que el EC negativo se asoció al grupo CONTROL ($p < 0,0001$).

De los 77 pacientes con el EC positivo en el grupo AR, 60 (57%) de ellos fueron heterocigotos y los 17 (16%) restantes fueron homocigotos. En el grupo NOAR la presencia de las formas heterocigotas fue idéntica al grupo AR (60 pacientes, 57%) mientras que sólo 5 pacientes (5%) presentaron el EC homocigoto. En el grupo CONTROL no se observó el EC homocigoto mientras que el EC heterocigoto se presentó en 17 pacientes (26%). Dentro de los distintos subtipos del EC (Figura 35), la presencia de los alelos HLA DR4, asociados a un mal pronóstico en la enfermedad, predominó en el grupo AR presentándose en 43 pacientes (40%) mientras que en los grupo NOAR y CONTROL la presencia fue significativamente menor apareciendo en 23 (22%) y 6 (9%) pacientes, respectivamente ($p < 0,0001$). Los alelos HLA DR1 predominaron en el grupo NOAR (35%,) mientras que la ausencia de las secuencias génicas del EC predominó en el grupo CONTROL.

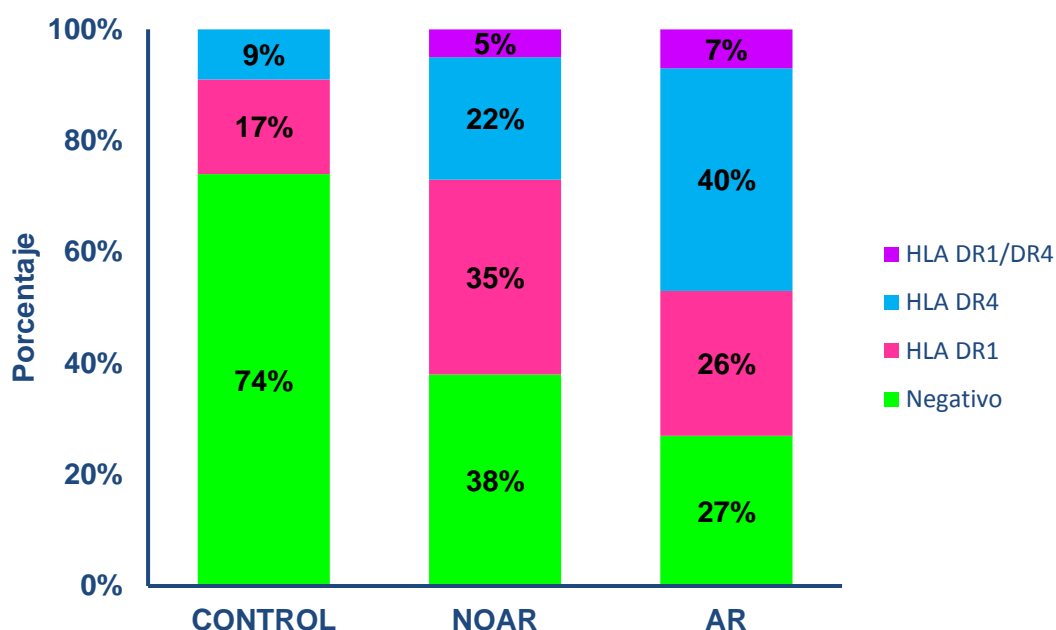


Figura 35. Frecuencia de los genotipos del EC en los distintos grupos.

Al estratificar el EC como negativo, heterocigoto HLA DR1, heterocigoto HLA DR4 y homocigoto; se observó que la presencia de las formas homocigotas y heterocigotas HLA DR4 se asociaron con el grupo AR y el heterocigoto HLA DR1 con el grupo NOAR ($p < 0,0001$) (Figura 36).

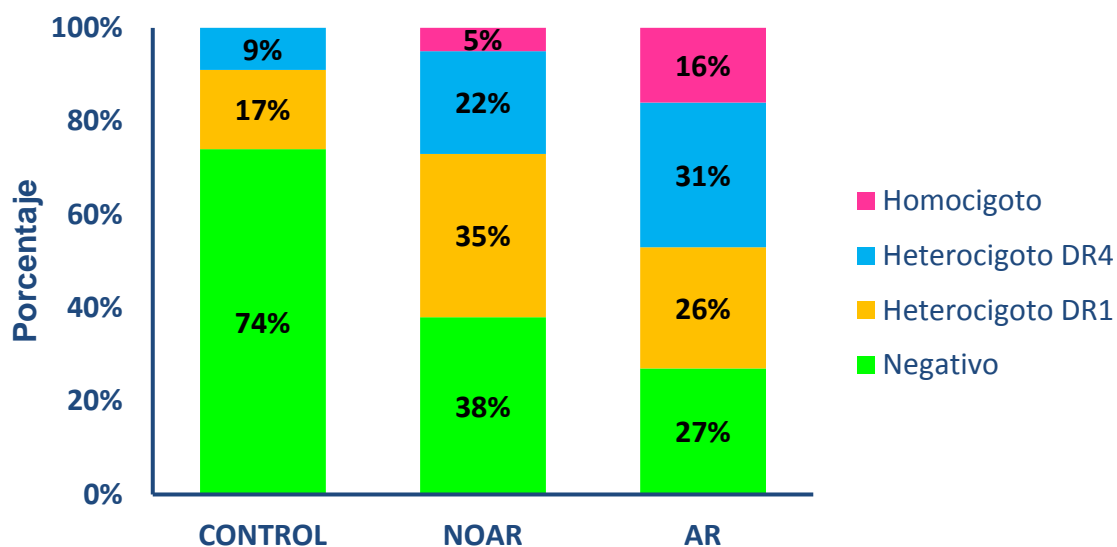


Figura 36. Frecuencia del carácter heterocigoto y homocigoto del EC.

Las combinaciones alélicas presentes en los sujetos estudiados se distribuyeron como se detalla en la tabla 19 y la figura 37. En el grupo CONTROL predominó el EC negativo (74%) ($p < 0,0001$).

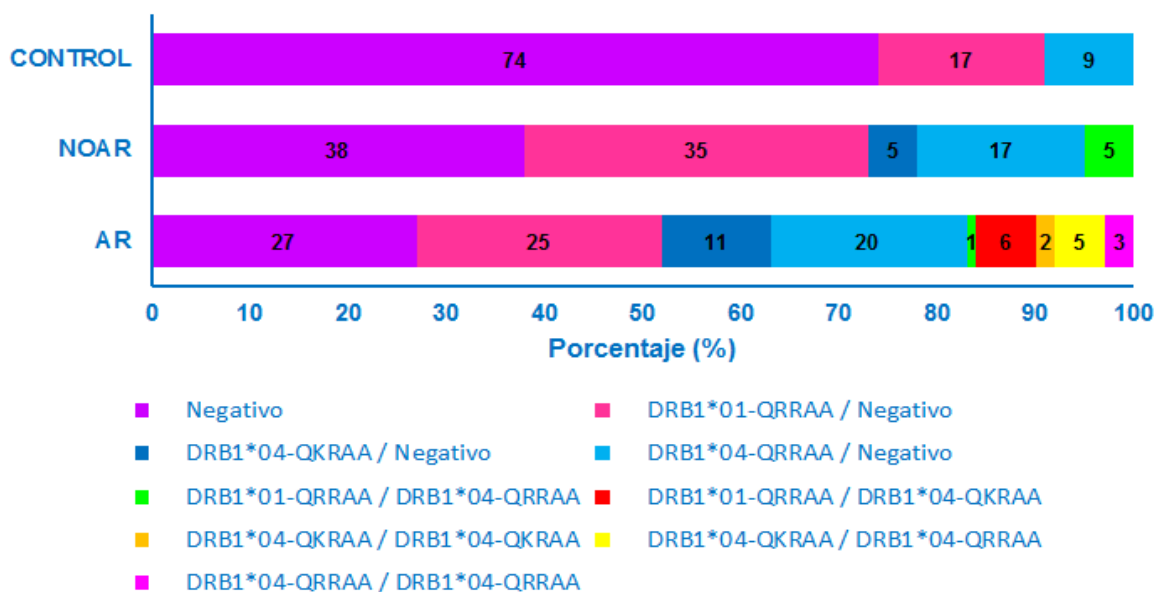


Figura 37. Frecuencia de las combinaciones alélicas del epítipo compartido en los grupos AR, NOAR y CONTROL.

La combinación alélica DRB1*01-QRRRAA/NEGATIVO, la más frecuente en nuestra población, predominó en el grupo NOAR (35%) mientras que la combinación DRB1*04-QRRRAA/NEGATIVO presentó una frecuencia similar en los grupos AR (20%) y NOAR (17%). La forma DRB1*04-QKRAA/NEGATIVO predominó en el grupo AR (11%) en relación a los otros dos grupos.

En cuanto a las combinaciones homocigotas; éstas estaban ausentes en el grupo CONTROL y la combinación DRB1*01-QRRRAA/DRB1*04-QRRRAA fue significativamente más frecuente en el grupo NOAR. El resto de combinaciones homocigotas, presentes en un bajo porcentaje cada una de ellas, se presentaron exclusivamente en el grupo AR: DRB1*01-QRRRAA/DRB1*04-QKRAA (6%), DRB1*04-QKRAA/DRB1*04-QKRAA (2%), DRB1*04-QKRAA/DRB1*04-QRRRAA (5%) y DRB1*04-QRRRAA/DRB1*04-QRRRAA (3%).

Asociación

4

entre los anticuerpos anti-CCP y FR

En el grupo AR se obtuvo una buena significación de la asociación entre anti-CCP y FR ($\chi^2=17,4$; $p<0,0001$, Tabla 20). Sesenta y cuatro (60%) de los 106 pacientes tuvieron positivos los anticuerpos anti-CCP y FR mientras que 15 pacientes (14%) fueron doble negativos. El FR fue positivo en el 81% de los pacientes con AR (86 de 106) mientras que los anti-CCP fueron positivos en el 65% de los pacientes con AR (69 de 106 pacientes). Los anti-CCP positivos se presentaron en 5 pacientes (5%) con FR negativo y el FR positivo en 22 pacientes (21%) con anti-CCP negativos.

	Anti CCP positivo	Anti CCP negativo	Total
FR positivo	64 (60)	22 (21)	86 (81)
FR negativo	5 (5)	15 (14)	20 (19)
Total	69 (65)	37 (35)	106 (100)

Tabla 20. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide en los pacientes con AR. Datos expresados como n (%).

En el grupo NOAR ($\chi^2=13,3$; $p<0,0001$, Tabla 21), 4 pacientes (4%) tuvieron positivos ambos anticuerpos (anti-CCP y FR) mientras que ambos anticuerpos fueron negativos en 80 pacientes (76%). El FR fue positivo en 21 pacientes (20%) con anti-CCP negativo mientras que los anticuerpos anti-CCP positivos no se presentaron en pacientes con FR negativo.

	Anti CCP positivo	Anti CCP negativo	Total
FR positivo	4 (4)	21 (20)	25 (24)
FR negativo	0	80 (76)	80 (76)
Total	4 (4)	101 (96)	105 (100)

Tabla 21. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide en los pacientes del grupo NOAR. Datos expresados como n (%).

En la figura 38 se representa el porcentaje de anticuerpos positivos presente en cada patología asociada al grupo NOAR.

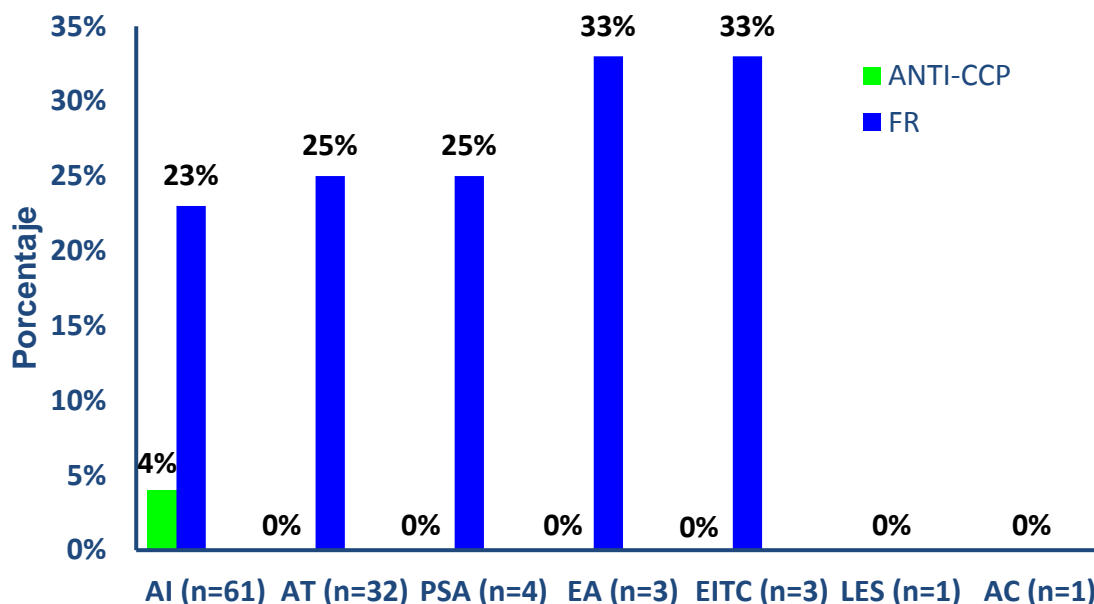


Figura 38. Porcentaje de anticuerpos anti-CCP y FR positivos en cada una de las entidades clínicas que se asocian al grupo NOAR.

En el grupo CONTROL, ningún sujeto presentó anti-CCP positivos mientras que el FR fue positivo en 7 sujetos (11%) y negativo en 58 sujetos (89%) de los 65 individuos que constituyeron este grupo.

5 Valor diagnóstico de los biomarcadores en una consulta de Atención Primaria

Los parámetros empleados para describir el valor diagnóstico de los marcadores bioquímicos en una consulta de Atención Primaria se encuentran en las tablas 22 y 23. Teniendo en cuenta los puntos de corte sugeridos por el fabricante y empleados en el laboratorio (Tabla 22); los anti-CCP (cut-off de 40 UI/mL) y FR (cut-off de 20 UI/mL) presentaron una S, E, VPP y VPN para el diagnóstico de AR de 66%, 98%, 95% y 82% y de 81%, 81%, 73% y 87%, respectivamente. Para el reactante de fase aguda PCR, el valor de estos parámetros fue de 72%, 59%, 52% y 78% respectivamente.

Los anti-CCP mostraron una mayor especificidad que FR y PCR, mostrando el FR una mayor sensibilidad que todos los demás. Se estudiaron combinaciones de los marcadores obteniendo con la combinación “anti-CCP+FR” una sensibilidad del 60% y una especificidad del 98% idéntica a los anticuerpos anti-CCP. Si a esta combinación incorporamos el marcador de inflamación PCR; disminuyó la sensibilidad al 46% y la especificidad no mejoró. La adición del FR y PCR no mejoró la sensibilidad de los anticuerpos anti-CCP y mantuvo la misma especificidad. Con la combinación “anti-CCP o FR” se obtuvo la mayor sensibilidad en atención primaria pero con una especificidad idéntica al FR.

Los resultados obtenidos muestran que los anti-CCP tuvieron un VPP del 95% superior tanto al resto de marcadores y combinaciones. Esto indica que en el 95% de los pacientes con esa prueba positiva se confirmaría la presencia de AR. El VPN más alto se obtuvo con la combinación “anti-CCP o FR” llegando a ser del 90%. Para el EC la sensibilidad fue del 72% similar a la PCR pero presentó la especificidad más baja (50%) en relación al resto de marcadores. El VPN fue idéntico a la combinación “anti-CCP+FR+PCR” pero el VPP fue el más bajo de todos los parámetros (48%).

Parámetros	S	E	VPP	VPN	LR+	LR-	OR (IC95%)	Valor p
Anti-CCP	66	98	95	82	27,5	0,4	80,69 (27,68-235,28)	< 0,0001
Anti-CCP+FR	60	98	94	80	25,2	0,4	63,24 (21,79-183,51)	< 0,0001
Anti-CCP+FR+PCR	46	98	92	75	25,7	0,6	47,85 (14,36-159,50)	< 0,0001
Anti-CCP o FR	86	81	74	90	4,6	0,2	26,16 (13,42-51,02)	< 0,0001
FR	81	81	73	87	4,3	0,2	18,54 (9,97-34,48)	< 0,0001
PCR	72	59	52	78	1,8	0,5	3,80 (2,24-6,43)	< 0,0001
EC	72	50	48	75	1,5	0,6	2,66 (1,57-4,48)	< 0,0001

Tabla 22. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LR+, LR- y OR diagnóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes del grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL.

Los anticuerpos anti-CCP tuvieron un LR+ muy superior al FR como se aprecia en la tabla 22. Con las combinaciones “anti-CCP+FR” y “anti-CCP+FR+PCR” no se mejoró y disminuyó ligeramente el LR+. El LR+ de la combinación “anti-CCP o FR” estuvo limitado por el FR. Asimismo, con el FR se obtuvo el LR- más bajo. Se construyeron las curvas ROC para cada uno de los marcadores bioquímicos y las combinaciones empleadas de los mismos (Figura 39).

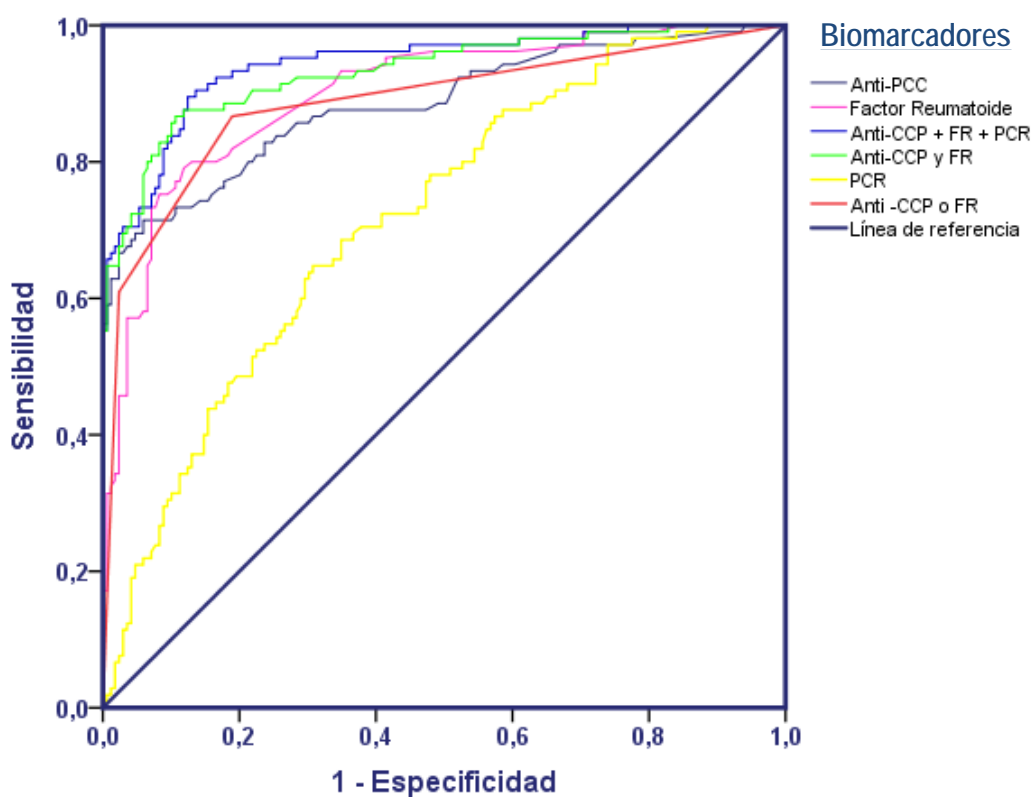


Figura 39. Curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL.

Como se observa en la figura 39, la mayor exactitud corresponde a las combinaciones “anti-CCP+FR+PCR” y “anti-CCP+FR” con un área bajo la curva de 0,94 y 0,93 respectivamente (Tabla 23). El AUC para los anti-CCP fue de 0,89 mientras que para el FR fue superior con un valor de 0,90. Según la curva ROC, el punto de corte más apropiado de los anticuerpos anti-CCP para el diagnóstico de AR fue de 22 U/mL (S=71%, E=94%), mientras que para el FR fue de 26 UI/mL (S=78%, E=88%).

No se encontraron diferencias significativas entre el AUC de “anti-CCP+FR+PCR” con “anti-CCP+FR” ($p=0,2$) y entre las curvas de los anti-CCP y del FR ($p=0,5$). Sin embargo, la diferencia resultó significativa entre la curva de los anti-CCP con las curvas de “anti-CCP+FR+PCR” ($p=0,005$), “anti-CCP+FR” ($p=0,002$) y PCR ($p<0,0001$). Las combinaciones “anti-CCP+FR+PCR” y “anti-CCP+FR” presentaron una mayor exactitud diagnóstica en relación a los anticuerpos anti-CCP aislados mientras que la exactitud de la PCR fue inferior a los anticuerpos anti-CCP.

Para el FR, las diferencias fueron significativas con las curvas de PCR ($p<0,0001$), “anti-CCP+FR” ($p=0,003$) y “anti-CCP+FR+PCR” ($p=0,003$). Las diferencias entre las curvas de PCR con “anti-CCP+FR+PCR” y “anti-CCP+FR” fueron significativas ($p<0,0001$).

Parámetros	AUC	E.T.	IC95%
Anti-CCP + FR + PCR	0,94	0,01	0,92-0,97
Anti-CCP + FR	0,93	0,02	0,90-0,97
FR	0,90	0,02	0,86-0,94
Anti-CCP o FR	0,89	0,02	0,84-0,93
Anti-CCP	0,89	0,02	0,84-0,93
PCR	0,72	0,03	0,66-0,78

Tabla 23. Área bajo la curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR+CONTROL.

6

Valor diagnóstico de los biomarcadores en consulta especializada de Artritis Precoz

Para una Consulta Especializada de Artritis Precoz se estudiaron los mismos parámetros empleados para describir el valor diagnóstico que en el caso anterior correspondiente a una consulta de Atención Primaria. Los resultados obtenidos se detallan en las tablas 24, 25 y en la figura 40.

Parámetros	S	E	VPP	VPN	LR+	LR-	OR (IC95%)	Valor p
Anti-CCP	66	96	95	74	17,4	0,4	49,10 (16,72-144,15)	< 0,0001
Anti-CCP+FR	60	96	94	71	15,9	0,4	38,48 (13,17-112,43)	< 0,0001
Anti-CCP+FR+PCR	46	96	94	64	15,9	0,6	29,23 (8,72-98,00)	< 0,0001
Anti-CCP o FR	86	73	78	84	3,6	0,2	19,41 (9,57-39,37)	< 0,0001
FR	81	76	78	80	3,4	0,3	13,76 (7,10-26,68)	< 0,0001
VSG	50	72	64	59	1,8	0,7	2,60 (1,43-4,63)	0,001
PCR	72	47	58	63	1,3	0,6	2,34 (1,31-4,15)	0,004
EC	72	38	54	58	1,2	0,7	1,63 (0,91-2,92)	0,09

Tabla 24. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, LR+, LR- y OR diagnóstico de los marcadores bioquímicos en los pacientes del grupo AR respecto al grupo NOAR

De todos los marcadores bioquímicos; los anticuerpos anti-CCP mostraron la mayor especificidad (96%) mientras que la combinación “anti-CCP o FR” presentó la mayor sensibilidad (86%). Con la combinación “anti-CCP+FR” se obtuvo una sensibilidad menor (60%) que para los anti-CCP pero la especificidad fue idéntica a los anti-CCP (96%).

Con la incorporación de la PCR a estos dos marcadores “anti-CCP+FR+PCR” se obtuvo una sensibilidad más baja aún (46%) con un aumento de la especificidad en una unidad (97%) en relación a los anti-CCP. Los anti-CCP presentaron el VPP más alto (95%) siendo superior al resto de marcadores y combinaciones. En cambio, el VPN más alto se obtuvo con la combinación “anti-CCP o FR” (84%). La adición de marcadores a los anti-CCP siguió un patrón similar a una consulta de Atención Primaria, con disminución de la sensibilidad y sin aumentar de manera significativa la especificidad excepto para el caso de “anti-CCP o FR” donde se obtuvo la mayor sensibilidad.

El EC presentó una sensibilidad (72%) idéntica a la PCR con E, VPP y VPN muy bajos siendo estos resultados no significativos ($p=0,09$). Para los anti-CCP el LR+ fue superior al FR y a las combinaciones entre los marcadores bioquímicos. El FR presentó el LR- más bajo. El LR+ disminuyó respecto a Atención Primaria para todos los parámetros presentando los anti-CCP el valor superior. Los LR- no se modificaron para los anti-CCP y las combinaciones “anti-CCP+FR+PCR”, “anti-CCP+FR” y “anti-CCP o FR” en relación a Atención Primaria.

En la figura 40, se representan las curvas ROC para estos marcadores. El mayor área bajo la curva y por tanto la mayor exactitud de una prueba se corresponde a las combinaciones “anti-CCP+FR+PCR” y “anti-CCP+FR” con un AUC de 0,93 y 0,92 respectivamente (tabla 25). El AUC para los anti-CCP fue de 0,88 mientras que para el FR fue ligeramente menor con un valor de 0,87 e idéntico a la combinación “anti-CCP o FR”. Según la curva ROC, el punto de corte más apropiado de los anticuerpos anti-CCP para el diagnóstico de AR fue de 38 U/mL (S=66%, E=96%), mientras que para el FR fue de 32 UI/mL (S=73%, E=90%).

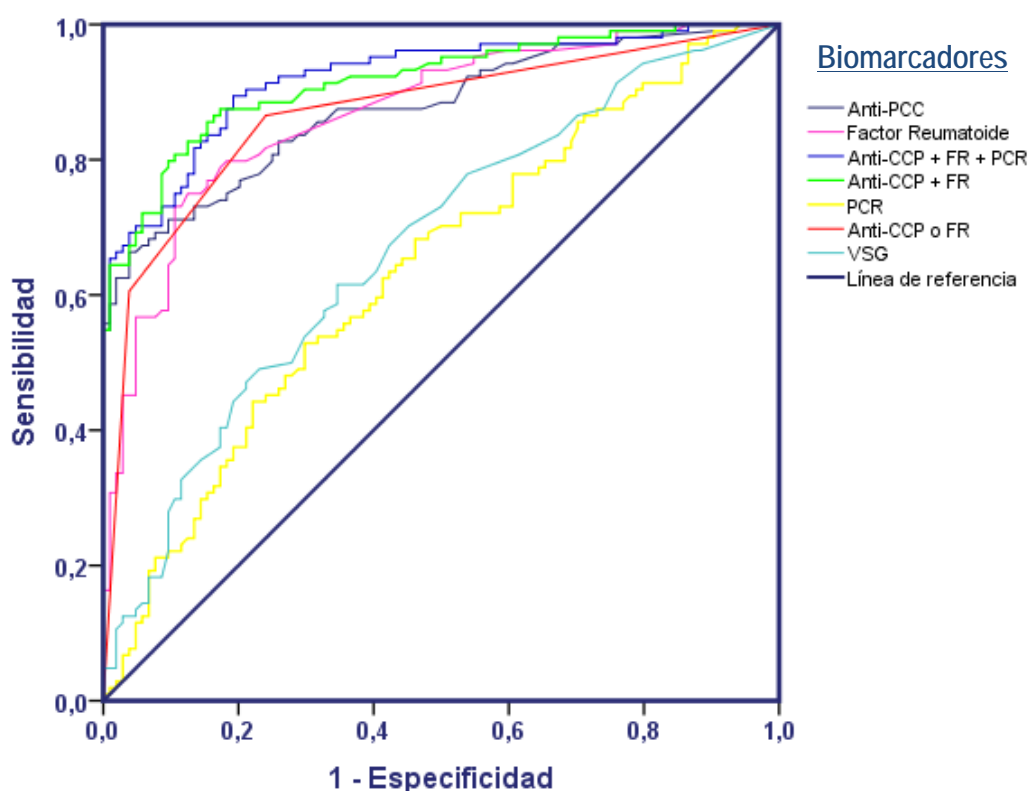


Figura 40. Curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR.

No se encontraron diferencias significativas entre el área bajo las curvas de “anti-CCP+FR+PCR” con “anti-CCP+FR” ($p=0,3$), anti-CCP con FR ($p=0,8$) y PCR con VSG ($p=0,3$). La diferencia resultó significativa entre las curvas de los anticuerpos anti-CCP con las combinaciones “anti-CCP+FR+PCR” ($p=0,004$) y “anti-CCP+FR” ($p=0,01$) mientras que para el FR las diferencias también fueron significativas con ambas combinaciones; “anti-CCP+FR” ($p=0,001$) y “anti-CCP+FR+PCR” ($p=0,001$).

Para los reactantes de fase aguda PCR y VSG, las diferencias resultaron significativas entre sus curvas y las definidas por “anti-CCP+FR” ($p<0,0001$), “anti-CCP+FR+PCR” ($p<0,0001$), anti-CCP ($p<0,0001$) y FR ($p<0,0001$).

Parámetros	AUC	E.T.	IC95%
Anti-CCP + FR + PCR	0,93	0,02	0,89-0,96
Anti-CCP + FR	0,92	0,02	0,88-0,95
Anti-CCP	0,88	0,02	0,83-0,92
Anti-CCP o FR	0,87	0,03	0,82-0,92
FR	0,87	0,03	0,82-0,92
VSG	0,67	0,04	0,59-0,75
PCR	0,64	0,04	0,56-0,71

Tabla 25. Área bajo la curva ROC de los marcadores bioquímicos de los pacientes en el grupo AR respecto al grupo NOAR.

7

Asociación entre el epitopo compartido y los anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con Artritis Reumatoide

En los 106 pacientes diagnosticados de AR (grupo AR) se estudió la asociación entre el EC y los anticuerpos anti-CCP y FR para determinar si la presencia del EC se correlaciona con la presencia del FR, anti-CCP o ambos anticuerpos. Como se observa en la tabla 26, la presencia del EC estuvo asociado con la presencia de anti-CCP con un OR de 2,68 (IC95% 1,11-6,46). En los pacientes con EC positivo, el 71% de ellos tuvieron los anti-CCP positivos en contraste a los pacientes con EC negativo donde este porcentaje se redujo al 48%. Sin embargo, para el FR, otro anticuerpo relacionado con el EC, no se encontró asociación significativa.

En aquellos casos donde ambos anticuerpos fueron positivos (“anti-CCP y FR positivos”), no se encontró asociación significativa entre el EC y la presencia concomitante de ambos anticuerpos aunque se observó un mayor porcentaje de pacientes con EC positivo y con “anti-CCP y FR positivos”.

Epitopo compartido	Anti-CCP negativo (n=37)	Anti-CCP positivo (n=69)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
Negativo	15 (52)	14 (48)	1,00	-	-
Positivo	22 (29)	55 (71)	2,68	1,11-6,46	0,03
Positivo Heterocigoto	18 (30)	42 (70)	2,50	1,00-6,24	0,04
Positivo Homocigoto	4 (23)	13 (77)	3,48	0,92-13,25	0,05
Epitopo compartido	FR negativo (n=20)	FR positivo (n=86)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
Negativo	8 (28)	21 (72)	1,00	-	-
Positivo	12 (16)	65 (84)	2,06	0,74-5,73	0,1
Positivo Heterocigoto	10 (17)	50 (83)	1,91	0,66-5,50	0,2
Positivo Homocigoto	2 (12)	15 (88)	2,86	0,53-15,41	0,2
Epitopo compartido	Anti-CCP y/o FR negativo (n=42)	Anti-CCP y FR positivo (n=64)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
Negativo	15 (52)	14 (48)	1,00	-	-
Positivo	27 (35)	50 (65)	1,98	0,84-4,72	0,1
Positivo Heterocigoto	21 (35)	39 (65)	1,99	0,81-4,90	0,1
Positivo Homocigoto	6 (35)	11 (65)	1,96	0,57-6,74	0,3

Tabla 26. Asociación entre el epitopo compartido y la presencia de anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con AR. Datos expresados como n (%).

⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado

Al categorizar el EC positivo como heterocigoto y homocigoto, no se observó asociación significativa con la presencia de FR y de ambos anticuerpos (Tabla 26). Sin embargo, para la presencia de anticuerpos anti-CCP, la asociación fue significativa con el EC positivo heterocigoto con un OR de 2,50 (IC95% 1,00-6,24, p=0,04) y mostró una significancia estadística marginal para el EC positivo homocigoto con un OR de 3,48 (IC95% 0,92-13,25, p=0,05).

Para determinar si los niveles de anticuerpos en suero (anti-CCP y FR) estaban relacionados con la presencia del EC, se estudió la asociación entre el EC y los niveles de dichos anticuerpos (Tabla 27).

	Epitopo compartido				Valor p
	Negativo (n=29)	Heterocigoto (n=60)	Homocigoto (n=17)	Positivo (n=77)	
Anti-CCP (U/mL)	17,5 (7,3-34)	177 (15,9-280)	207 (45-320)	177 (16-301)	< 0,0001 ⁽¹⁾ <0,0001 ⁽²⁾
FR (UI/mL)	33,2 (20-59)	77,3 (39,5-225,5)	92 (35-210)	83 (39-224)	< 0,0001 ⁽¹⁾ 0,001 ⁽²⁾

Tabla 27. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el EC. Datos expresados como mediana (IQR). ⁽¹⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney entre las categorías del EC definidas por negativo/positivo. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis entre las categorías del EC definidos por negativo/heterocigoto/homocigoto.

Los niveles de los anticuerpos anti-CCP (Tabla 27 y Figura 41) fueron de 17,5 (7,3-34) U/mL en los pacientes que tenían el EC negativo, 177 (15,9-280) U/mL en aquellos con EC heterocigoto, 207 (45-320) U/mL en aquellos con EC homocigoto o con dos alelos del EC y de 177 (16-301) U/mL en pacientes con EC positivo (formado por la combinación de las categorías heterocigotos y homocigotos). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de anti-CCP entre los grupos del EC definidos por negativo/positivo ($p < 0,0001$), negativo/heterocigoto ($p < 0,0001$) y negativo/homocigoto ($p = 0,001$). Entre los grupos heterocigoto/homocigoto no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,9$).

Del mismo modo, los niveles para el FR (Tabla 27 y Figura 42) fueron de 33,2 (20-59) UI/mL, 77,3 (39,5-225,5) UI/mL, 92 (35-210) UI/mL y 83 (39-224) UI/mL para los pacientes con EC negativo, heterocigoto, homocigoto y positivo respectivamente. Las diferencias significativas encontradas entre los niveles de FR se apreciaron entre los grupos del EC negativo/positivo ($p < 0,0001$), negativo/heterocigoto ($p = 0,001$) y negativo/homocigoto ($p = 0,01$). Al igual que ocurre con los anti-CCP, entre los grupos heterocigoto/homocigoto no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,9$).

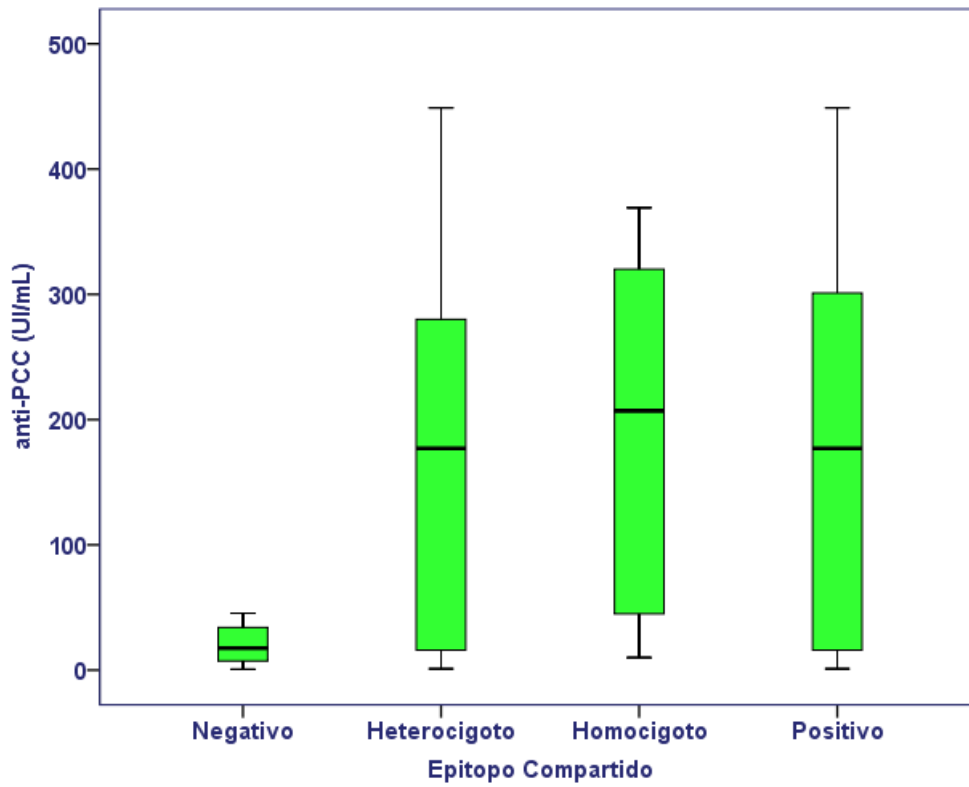


Figura 41. Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el EC.

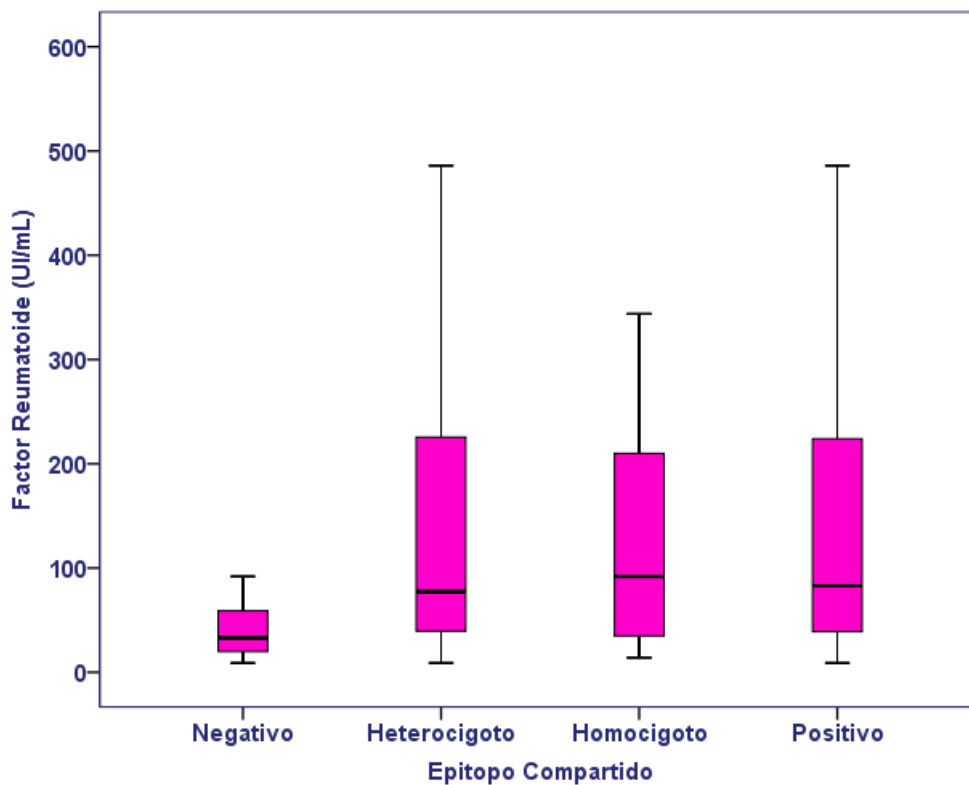


Figura 42. Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el EC.

8

Asociación entre el hábito tabáquico y los anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con Artritis Reumatoide

Se estudió la asociación entre el hábito tabáquico y los anticuerpos anti-CCP y FR para determinar si el hábito tabáquico se correlaciona con la presencia del FR, los anti-CCP o ambos autoanticuerpos (Tabla 28).

Hábito tabáquico	Anti-CCP negativo (n=37)	Anti-CCP positivo (N=69)	OR	IC95%	Valor p ⁽²⁾
No Fumador	29 (43)	39 (57)	1,00	-	-
Fumador ⁽¹⁾	8 (21)	30 (79)	2,79	1,12-6,97	0,03
Ex Fumador	2 (15)	11 (85)	4,09	0,84-19,88	0,06
Fumador activo	6 (24)	19 (76)	2,36	0,84-6,64	0,1
Hábito tabáquico	FR negativo (n=20)	FR positivo (n=86)	OR	IC95%	Valor p ⁽²⁾
No Fumador	17 (25)	51 (75)	1,00	-	-
Fumador ⁽¹⁾	3 (8)	35 (92)	3,89	1,06-14,28	0,04
Ex Fumador	1 (8)	12 (92)	4,00	0,48-33,08	0,2
Fumador activo	2 (8)	23 (92)	3,83	0,82-17,98	0,1
Hábito tabáquico	Anti-CCP y/o FR negativo (n=42)	Anti-CCP y FR positivo (n=64)	OR	IC95%	Valor p ⁽²⁾
No Fumador	32 (47)	36 (53)	1,00	-	-
Fumador ⁽¹⁾	10 (26)	28 (74)	2,49	1,05-5,91	0,04
Ex Fumador	3 (23)	10 (77)	2,96	0,75-11,72	0,1
Fumador activo	7 (28)	18 (72)	2,29	0,85-6,18	0,1

Tabla 28. Asociación entre el hábito tabáquico y la presencia de anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes con AR. Datos expresados como n (%). ⁽¹⁾ La categoría "Fumador" engloba a ex fumadores y fumadores activos. ⁽²⁾ Prueba de Chi cuadrado.

El hábito tabáquico estuvo asociado con la presencia de anti-CCP positivos con un OR de 2,79 (IC95% 1,12-6,97). En los pacientes fumadores, el 79% de ellos presentaron los anti-CCP positivos en contraste con los pacientes no fumadores donde

este porcentaje fue del 57%. Para el FR se obtuvo un OR de 3,89 (IC95% 1,06-14,28) siendo el FR positivo en el 92% y 75% de los pacientes con hábito tabáquico positivo y negativo respectivamente. En los pacientes con anti-CCP y FR positivos, ambos anticuerpos fueron positivos simultáneamente en el 74% de los pacientes fumadores con un OR 2,49 (IC95% 1,05-5,91).

Al separar a los pacientes fumadores en los dos grupos “ex fumador” y “fumador activo”; no se observaron diferencias estadísticamente significativas con la presencia de anti-CCP, FR o ambos anticuerpos (Tabla 28). Del mismo modo que para el EC; se estudió la asociación entre el hábito tabáquico y los niveles de anticuerpos para determinar si los niveles de los anticuerpos (anti-CCP y FR) estaban relacionados con el hábito tabáquico (Tabla 29).

	Hábito tabáquico				Valor p
	No Fumador (n=68)	Ex Fumador (n=13)	Fumador activo (n=25)	Fumador ⁽¹⁾ (n=38)	
Anti-CCP (U/mL)	39,5 (6,6-210,5)	200 (59,5-318)	127,55 (16,9-290,5)	177 (17,5-301)	0,02 ⁽²⁾ 0,05 ⁽³⁾
FR (UI/mL)	43 (20,5-128)	78 (67,2-285)	89 (34,6-215)	83,5 (41-258)	0,01 ⁽²⁾ 0,04 ⁽³⁾

Tabla 29. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico. Datos expresados como mediana (IQR). ⁽¹⁾ La categoría “Fumador” engloba tanto a “ex fumadores” como “fumadores activos”. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar entre los grupos definidos por “fumador” y “no fumador”. ⁽³⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis para comparar entre grupos definidos por “no fumador”, “ex fumador” y “fumador activo”.

La concentración de anti-CCP (tabla 29 y figura 43) fue de 177 (17,5-301) U/mL en los pacientes fumadores y de 39,5 (6,6-210,5) U/mL en los pacientes no fumadores. Las diferencias entre ambos grupos fueron significativas (p=0,02). Las concentraciones para los ex fumadores fueron de 200 (59,5-318) U/mL mientras que para los fumadores activos fueron de 127,55 (16,9-290,5) U/mL. El análisis estadístico entre no fumadores, ex fumadores y fumadores activos mostró un resultado marginal (p=0,05).

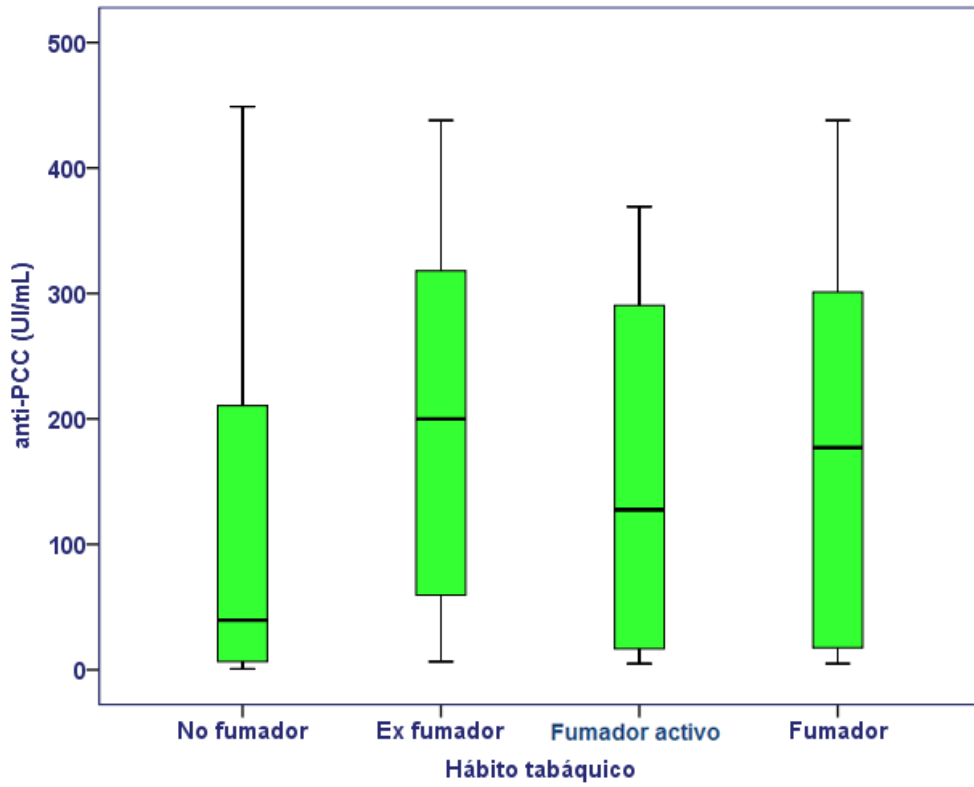


Figura 43. Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico.

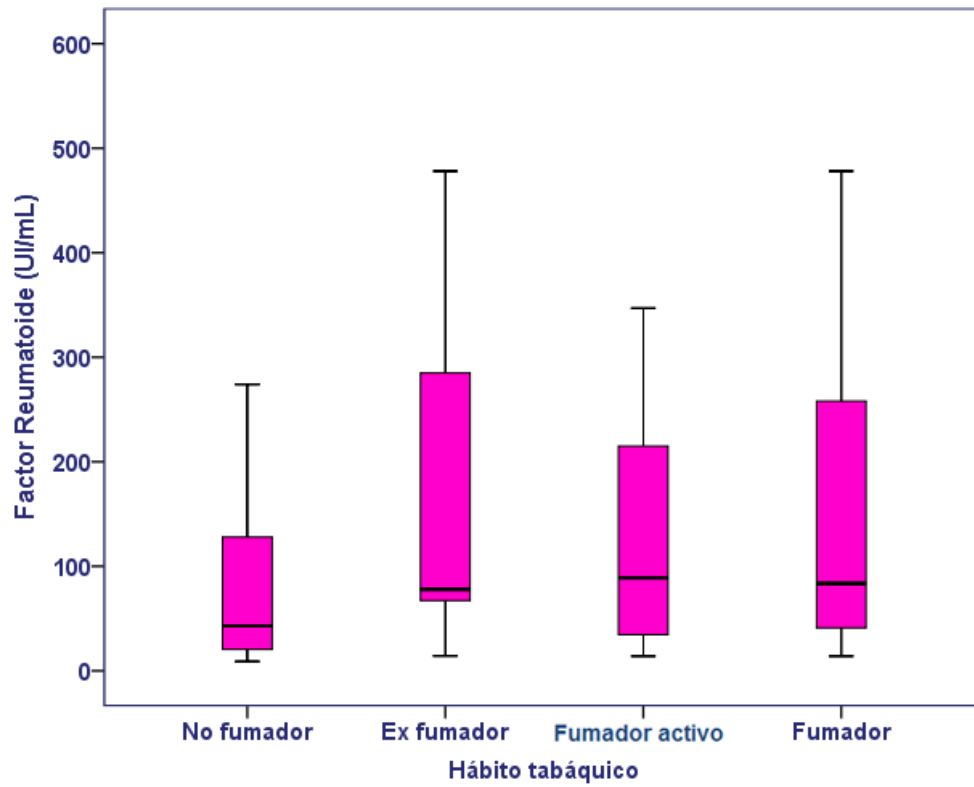


Figura 44. Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el hábito tabáquico.

Para el FR (Tabla 29 y Figura 44), los niveles fueron de 83,5 (41-258) UI/mL y de 43 (20,5-258) UI/mL para los pacientes fumadores y no fumadores, respectivamente. Las diferencias encontradas entre los niveles fueron estadísticamente significativas ($p=0,01$). Las concentraciones para los ex fumadores fueron de 78 (67,2-285) UI/mL mientras que para los fumadores activos fueron de 89 (34,6-215) UI/mL. En los test post-hoc sólo se encontraron diferencias significativas en los niveles de FR entre los pacientes no fumadores y ex fumadores ($p=0,03$).

Por último, en los pacientes con AR también se estudió si la cantidad de tabaco consumido influía sobre los anticuerpos anti-CCP y FR. En primer lugar se estudió la asociación entre el índice de tabaquismo y la presencia de anticuerpos (Tabla 30).

Índice de Tabaquismo	Anti-CCP negativo (n=37)	Anti-CCP positivo (n=69)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
IT Negativo	29 (43)	39 (57)	1,00	-	-
IT Bajo (1-20 paq./año)	6 (50)	6 (50)	0,90	0,20-2,54	0,7
IT Alto (>20 paq./año)	2 (8)	24 (92)	8,93	1,95-40,82	0,005
Índice de Tabaquismo	FR negativo (n=20)	FR positivo (n=86)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
IT Negativo	17 (25)	51 (75)	1,00	-	-
IT Bajo (1-20 paq./año)	2 (17)	10 (83)	1,67	0,33-8,37	0,5
IT Alto (>20 paq./año)	1 (4)	25 (96)	8,33	1,05-66,22	0,04
Índice de Tabaquismo	Anti-CCP y/o FR negativo (n=42)	Anti-CCP y FR positivo (n=64)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
IT Negativo	32 (47)	36 (53)	1,00	-	-
IT Bajo (1-20 paq./año)	7 (58)	5 (42)	0,64	0,18-2,20	0,5
IT Alto (>20 paq./año)	3 (11)	23 (89)	6,82	1,87-24,85	0,004

Tabla 30. Asociación entre el índice de tabaquismo y la presencia de anti-CCP y FR en los pacientes con AR. Datos expresados como n (%). ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado.

Un índice de tabaquismo alto estuvo asociado con la presencia de anti-CCP positivos con un OR de 8,93 (IC95% 1,95-40,82). En ellos, el 92% presentaron los anti-CCP positivos en contraste con los pacientes con un índice de tabaquismo bajo y

negativo donde los porcentajes descendieron al 50 y 57%, respectivamente. Para el FR se obtuvo un OR de 8,33 (IC95% 1,05-66,22) siendo el FR positivo en el 96% y 83% de los pacientes con índice de tabaquismo alto y bajo respectivamente. En los pacientes con anti-CCP y FR positivos, éstos fueron positivos simultáneamente en el 89% de los pacientes con índice de tabaquismo alto (OR 6,82 con IC95% de 1,87-24,85) mientras que en los pacientes con índice de tabaquismo bajo el porcentaje fue del 42%.

En segundo lugar se evaluaron los niveles de los anticuerpos según el índice de tabaquismo (Tabla 31 y figuras 45 y 46). La concentración de los anticuerpos anti-CCP fueron de 192,5 (29-309,5) U/mL en los pacientes con índice de tabaquismo alto y de 29,3 (11,5-240) U/mL en los pacientes con índice de tabaquismo bajo. Para el FR, sus concentraciones fueron de 100 (56,9-266) UI/mL y de 76,2 (34,8-92) UI/mL, respectivamente. En los pacientes no fumadores, los niveles de anti-CCP y FR fueron de 39,5 (6,6-210,5) U/mL y de 43 (21-128) UI/mL, respectivamente.

	Índice de tabaquismo			Valor p ⁽¹⁾
	Negativo (n=68)	Bajo (1-20 paq./año) (n=12)	Alto (>20 paq./año) (n=26)	
Anti-CCP (U/mL)	39,5 (6,6-210,5)	29,3 (11,5-240)	192,5 (29-309,5)	0,03
FR (UI/mL)	43 (21-128)	76,2 (34,8-92)	100 (56,9-266)	0,03

Tabla 31. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según el consumo de tabaco. Datos expresados como mediana (IQR). ⁽¹⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis entre las categorías del índice de tabaquismo.

En los test post-hoc se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con IT negativo y alto para los niveles de anti-CCP (p=0,01) y de FR (p=0,01).

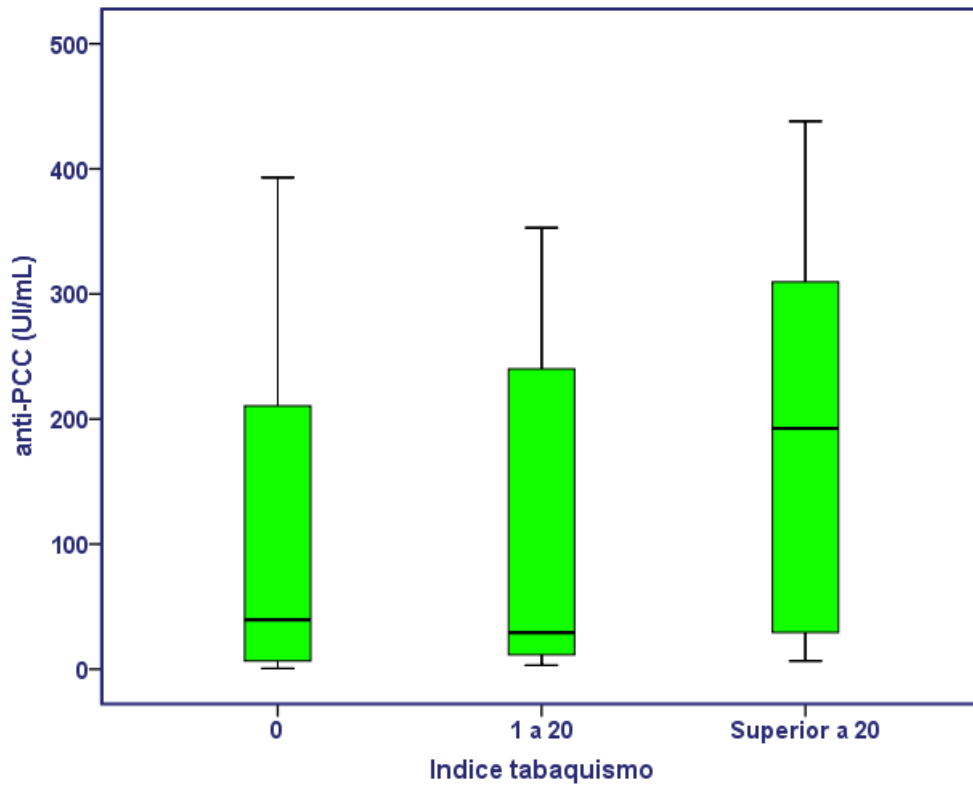


Figura 45. Niveles de anti-CCP (U/mL) en pacientes con AR según el índice de tabaquismo.

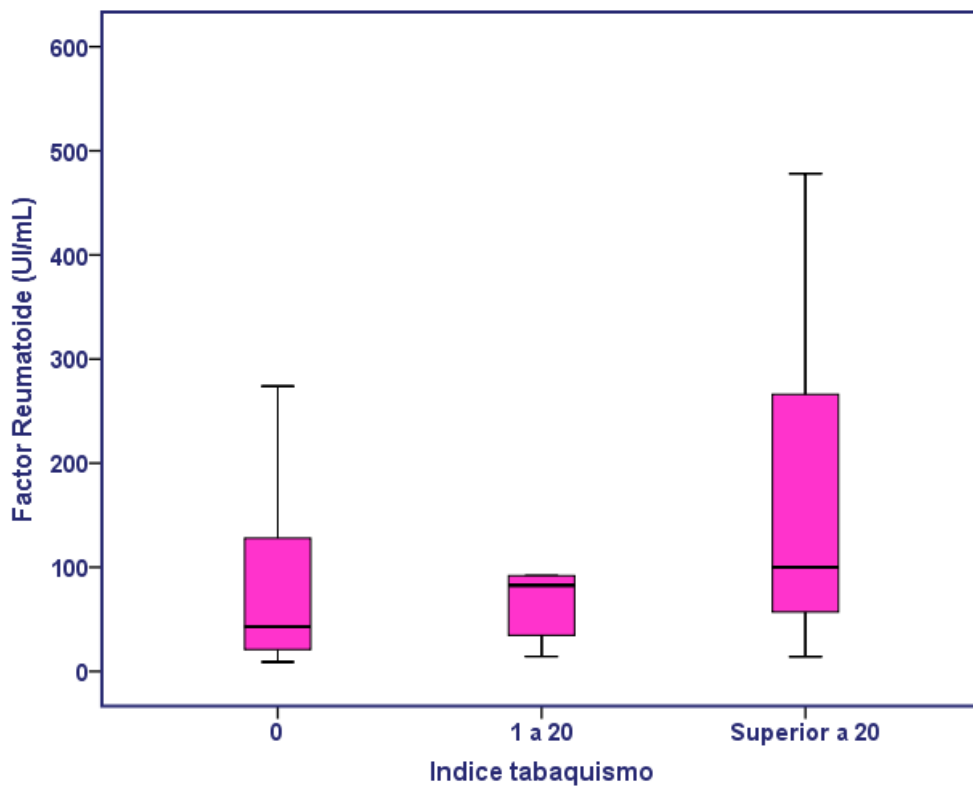


Figura 46. Niveles de FR (UI/mL) en pacientes con AR según el índice de tabaquismo.

9

Interacción entre el hábito tabáquico y el epitopo compartido sobre los anticuerpos en los pacientes con Artritis Reumatoide

Según los resultados obtenidos en los dos apartados anteriores, la presencia de los anticuerpos anti-CCP estuvo asociada con el EC ($p=0,03$ Tabla 26), el hábito tabáquico ($p=0,03$; Tabla 28) y un índice de tabaquismo alto ($p=0,005$; Tabla 30). En el caso del FR, esta asociación no fue estadísticamente significativa para el EC (Tabla 26) pero sí fue para el hábito tabáquico ($p=0,04$; Tabla 28) y un índice de tabaquismo alto ($p=0,04$; Tabla 30). De esta manera, sólo se procedió a estudiar la posible interacción entre el EC y el hábito tabáquico sobre los anticuerpos anti-CCP. En primera instancia, se estudió el efecto del hábito tabáquico en relación al EC sobre los anticuerpos anti-CCP. Para ello, los pacientes fueron estratificados de acuerdo a la presencia del EC y se evaluó si la presencia del hábito tabáquico aumentó el riesgo de anti-CCP positivos en presencia o ausencia del EC.

	Anti-CCP negativo (n=37)	Anti-CCP positivo (n=69)	OR	IC95%	Valor p ⁽²⁾
EC negativo (N=29)					
No Fumador	11 (55)	9 (45)	1,00	-	-
Fumador ⁽¹⁾	4 (44)	5 (56)	1,53	0,31-7,44	0,6
EC positivo (N=77)					
No Fumador	18 (37)	30 (63)	1,00	-	-
Fumador ⁽¹⁾	4 (14)	25 (86)	3,75	1,12-12,53	0,02

Tabla 32. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el hábito tabáquico en los pacientes con AR estratificado según el EC. Datos expresados como n (%). ⁽¹⁾ La categoría "Fumador" engloba tanto a "ex fumadores" como "fumadores activos". ⁽²⁾ Prueba de Chi cuadrado.

En los pacientes con EC positivo (Tabla 32 y figura 47), el hábito tabáquico estuvo asociado con un OR de 3,75 (IC95% 1,12-12,53; $p=0,02$) para la presencia de anticuerpos anti-CCP. Sin embargo, en los pacientes con EC negativo (Tabla 32 y

figura 48), la presencia del hábito tabáquico no se tradujo en un riesgo significativo de presentar anticuerpos anti-CCP siendo el OR de 1,53 (IC95% 0,31-7,44; p=0,6).

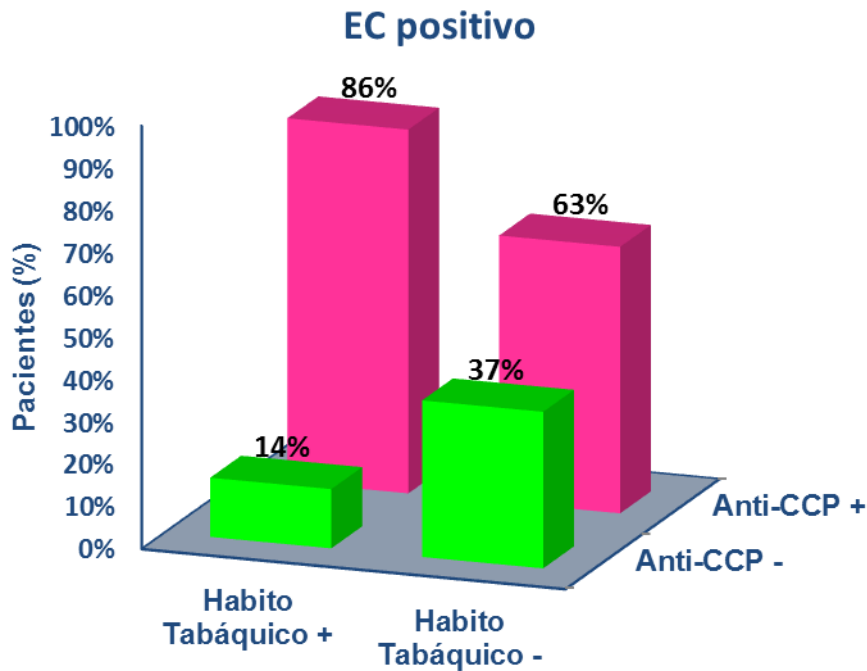


Figura 47. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el hábito tabáquico en los pacientes diagnosticados de AR y con EC positivo (n=77). El porcentaje hace referencia a los pacientes con anti-CCP positivos y negativos dentro de cada categoría del hábito tabáquico.

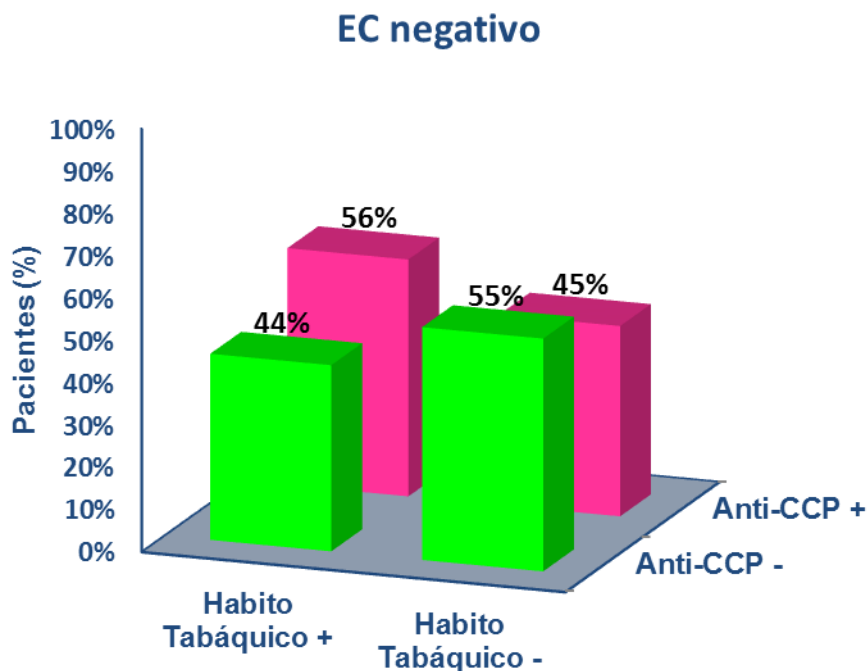


Figura 48. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el hábito tabáquico en los pacientes diagnosticados de AR y con EC negativo (n=29). El porcentaje hace referencia a los pacientes con anti-CCP positivos y negativos dentro de cada categoría del hábito tabáquico.

A continuación, se estudió además si existía asociación entre el EC y el índice de tabaquismo sobre la presencia de anticuerpos anti-CCP. En este caso, los pacientes fueron estratificados de acuerdo a la presencia del EC y se evaluó si el índice de tabaquismo, definido por “negativo”, “bajo (1-20 paquetes/año)” y “alto (>20 paquetes/año)” aumenta el riesgo de anti-CCP positivos en presencia o ausencia del EC.

En los pacientes con EC negativo (Tabla 33 y figura 49), el índice de tabaquismo no se asoció significativamente a un mayor porcentaje de anticuerpos anti-CCP positivos. Sin embargo, en los pacientes con EC positivo (Tabla 33 y figura 50) un índice de tabaquismo alto se asoció con un mayor porcentaje de anticuerpos anti-CCP positivos (OR de 12,00; IC95% 1,48-97,17).

	Anti-CCP negativo (n=37)	Anti-CCP positivo (n=69)	OR	IC95%	Valor p ⁽¹⁾
EC negativo (N=29)					
IT Negativo	11 (55)	9 (45)	1,00	-	-
IT Bajo	3 (75)	1 (25)	0,41	0,03-4,62	0,5
IT Alto	1 (20)	4 (80)	4,89	0,46-51,86	0,2
EC positivo (N=77)					
IT Negativo	18 (37)	30 (63)	1,00	-	-
IT Bajo	3 (37)	5 (63)	1,00	0,21-4,69	1,0
IT Alto	1 (5)	20 (95)	12,00	1,48-97,17	0,02

Tabla 33. Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y el índice de tabaquismo en los pacientes con AR estratificado según el EC. Datos expresados como n (%). ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado.

EC negativo

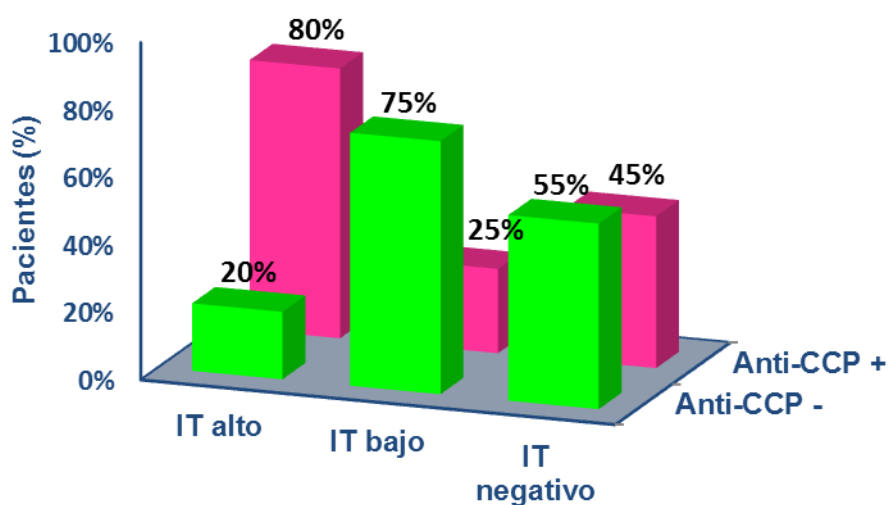


Figura 49. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el índice de tabaquismo en los pacientes diagnosticados de AR y con EC negativo (n=29). El porcentaje hace referencia a los pacientes con anti-CCP positivos y negativos dentro de cada categoría del índice de tabaquismo.

EC positivo

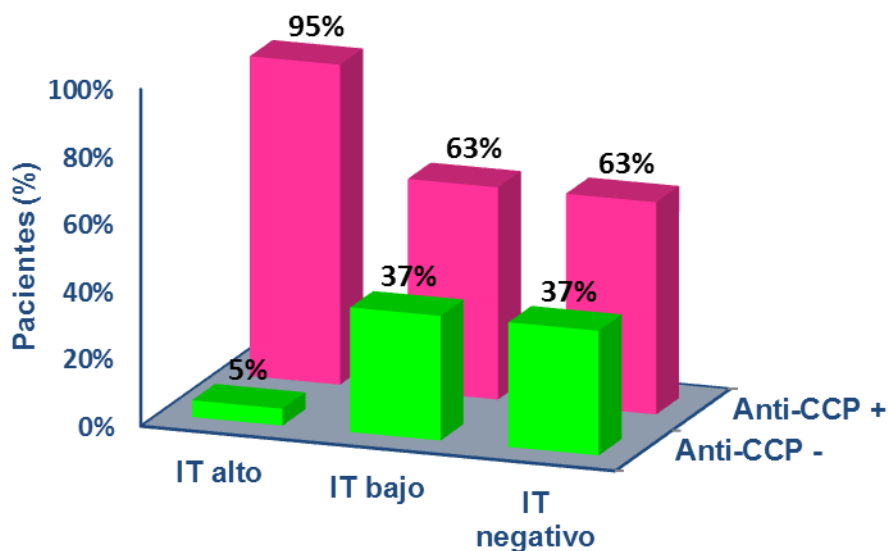


Figura 50. Porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos y negativos según el índice de tabaquismo en los pacientes diagnosticados de AR y con EC positivo (n=77). El porcentaje hace referencia a los pacientes con anti-CCP positivos y negativos dentro de cada categoría del índice de tabaquismo.

Por último, para comprobar si los factores estudiados (EC, hábito tabáquico e índice de tabaquismo) estaban asociados independientemente con la **presencia de anticuerpos anti-CCP** y confirmar la existencia de una interacción significativa entre ellos se obtuvo un modelo de regresión logística. En este modelo (Tabla 34), los únicos factores independientemente relacionados con la presencia de anti-CCP fueron la presencia del EC y de un índice de tabaquismo alto. El R² del modelo fue del 30%.

Variables	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
	OR (IC95%)	Valor p	OR (IC95%)	Valor p
EC positivo	2,68 (1,11-6,46)	0,03	2,77 (1,07-7,12)	0,03
EC heterocigoto	2,50 (1,00-6,24)	0,04	-	-
EC homocigoto	3,48 (0,92-13,25)	0,05	-	-
Fumador ⁽¹⁾	2,79 (1,12-6,97)	0,03	-	-
Ex fumador	4,09 (0,84-19,88)	0,06	-	-
IT alto (>20 paquetes/año)	8,93 (1,95-40,82)	0,005	9,55 (2,07-44,03)	0,004
Términos de interacción	OR (IC95%)	Valor p	OR (IC95%)	Valor p
EC positivo x IT alto	-	-	5,34 (0,5-63,06)	0,2

Tabla 34. Análisis multivariante por regresión logística de las variables que influyen independientemente en la presencia de anticuerpos anti-CCP en los pacientes con AR. ⁽¹⁾ La categoría “Fumador” engloba a “ex fumadores” y “fumadores activos”. En el análisis univariante se resumen las variables independientes asociadas con la presencia de anti-CCP (Tablas 26, 28 y 30) y que se incluyeron inicialmente en el modelo multivariante. Variables de confusión: sexo, edad. Variable dependiente: anticuerpos anti-CCP.

En relación a los **niveles séricos de los anticuerpos**; se analizó si los niveles de anticuerpos anti-CCP y FR estaban asociados con el hábito tabáquico (definido como no fumador y fumador) en presencia del EC; es decir, tras observar que el EC y el hábito tabáquico por separado estaban asociados con niveles más altos de anti-CCP y de FR (tablas 27 y 29) se estudió la interacción de estos factores genéticos y ambientales. Para ello, se agruparon los pacientes en cuatro grupos definidos por la combinación de dichas variables: “EC negativo/No fumador”, “EC negativo/Fumador”, “EC positivo/No fumador” y “EC positivo/Fumador” y se compararon los niveles de anti-CCP y FR en cada grupo como primera aproximación (Tabla 35 y figuras 51 y 52).

	EC negativo no fumador (N=20)	EC negativo y fumador (N=9)	EC positivo y no fumador (N=48)	EC positivo y fumador (N=29)	Valor p ⁽¹⁾
Anti-CCP (U/mL)	23,9 (7-36,5)	14,6 (8,4-21,8)	99 (7,1-272,7)	203,8 (84-318)	< 0.0001
FR (UI/mL)	32 (20-48,7)	45,8 (33,1-77)	64,4 (27-190)	100 (67,2-285)	< 0.0001

Tabla 35. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según la combinación de las variables epítipo compartido y hábito tabáquico. Datos expresados como mediana (IQR). ⁽¹⁾ Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar entre los 4 grupos definidos por las posibles combinaciones entre EC y el hábito tabáquico.

Los niveles de los anticuerpos anti-CCP (Tabla 35 y Figura 51) fueron de 23,9 (7-36,5) U/mL en el grupo “EC negativo/No fumador”, 14,6 (8,4-21,8) U/mL para “EC negativo/Fumador”, 99 (7,1-272,7) U/mL para “EC positivo/No fumador” y 203,8 (84-318) U/mL para “EC positivo/Fumador”. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo de referencia “EC negativo/No fumador” y los grupos definidos por “EC positivo/No fumador” ($p < 0,0001$) y “EC positivo/Fumador” ($p < 0,0001$). Las diferencias también fueron significativas entre el grupo “EC negativo/Fumador” y los grupos definidos por “EC positivo/No fumador” ($p < 0,0001$) y “EC positivo/Fumador” ($p < 0,0001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos “EC negativo/No fumador” y “EC negativo/Fumador” ($p = 0,3$) y los grupos “EC positivo/No fumador” y “EC positivo/Fumador” ($p = 0,2$).

Para el FR (Tabla 35 y Figura 52), los niveles de los anticuerpos fueron de 32 (20-48,7) UI/mL en el grupo “EC negativo/No fumador”, 45,8 (33,1-77) UI/mL para “EC negativo/Fumador”, 64,4 (27-190) UI/mL para “EC positivo/No fumador” y 100 (67,2-285) UI/mL para “EC positivo/Fumador”. Las diferencias encontradas se apreciaron entre los mismos grupos que para los anticuerpos anti-CCP: “EC negativo/No fumador” con “EC positivo/No fumador” ($p = 0,001$) y “EC positivo/Fumador” ($p < 0,0001$); “EC negativo/Fumador” con “EC positivo/No fumador” ($p = 0,01$) y “EC positivo/Fumador” ($p = 0,001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos “EC negativo/No fumador” y “EC negativo/Fumador” ($p = 0,7$) y los grupos “EC positivo/No fumador” y “EC positivo/Fumador” ($p = 0,5$).

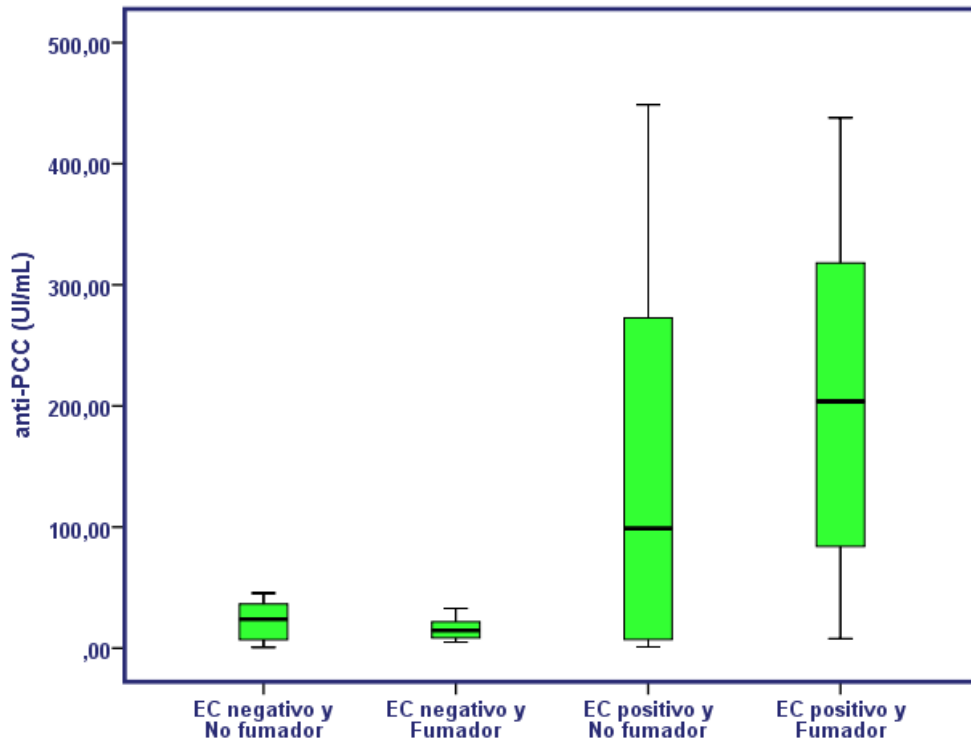


Figura 51. Niveles de anti-CCP (U/mL) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido y hábito tabáquico.

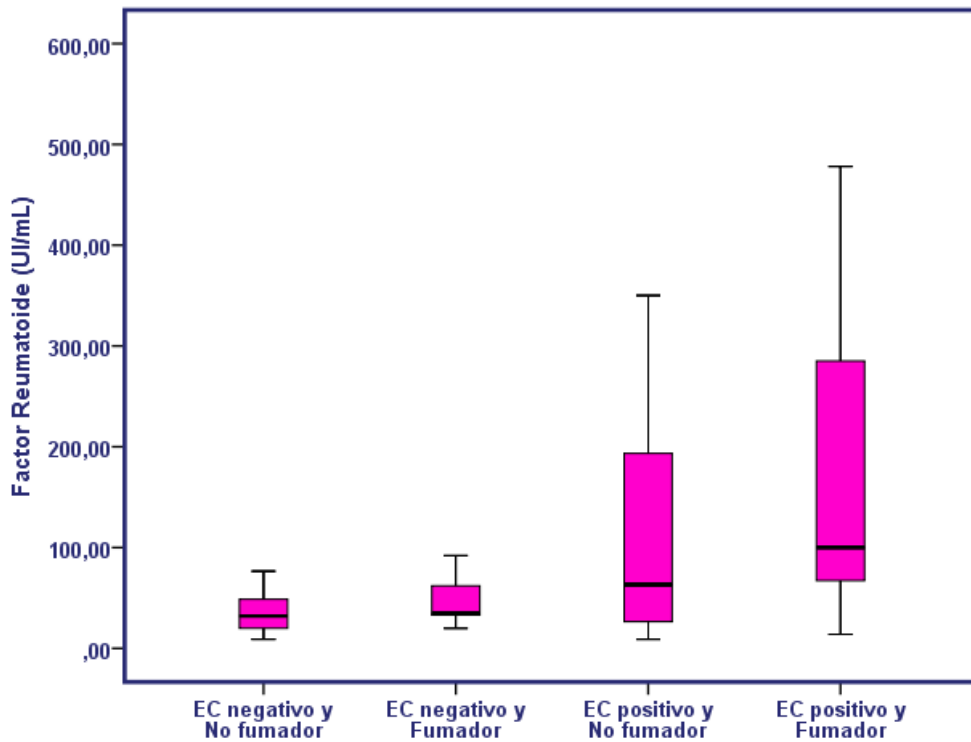


Figura 52. Niveles de FR (UI/ml) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido y hábito tabáquico.

Del mismo modo que se procedió para el hábito tabáquico, se estudió si los niveles de los anticuerpos estaban asociados con el índice de tabaquismo en presencia del EC. Para ello, las categorías del índice de tabaquismo definidos por “Negativo” y “1 a 20 paquetes/año” se fusionaron en una nueva categoría para simplificar los cálculos quedando la variable redefinida como “≤20 paquetes/año” y “>20 paquetes/año. Los pacientes se agruparon en cuatro grupos definidos por la combinación de dichas variables y se compararon los niveles de anti-CCP y FR en cada grupo como primera aproximación (Tabla 36 y figuras 53 y 54).

	EC negativo y IT≤20 paquetes/año (N=23)	EC negativo y IT>20 paquetes/año (N=6)	EC positivo y IT≤20 paquetes/año (N=57)	EC positivo y IT>20 paquetes/año (N=20)	Valor p ⁽¹⁾
Anti-CCP (U/mL)	13 (5,5-35,6)	16,9 (10,2-26)	99 (10,6-280)	214,9 (127,6-339,1)	< 0.0001
FR (UI/mL)	32 (20-48,7)	45,1 (33-62)	64,4 (27-190)	180 (75,9-285)	< 0.0001

Tabla 36. Niveles de anti-CCP (U/mL) y FR (UI/mL) en pacientes con AR según la combinación de las variables epitopo compartido y índice de tabaquismo. Datos expresados como mediana (IQR). ⁽¹⁾ Prueba no paramétrica de Krustal-Wallis para comparar entre los 4 grupos definidos por las posibles combinaciones entre EC e IT.

Para los anticuerpos anti-CCP (Tabla 36 y figura 53) se encontraron diferencias significativas entre el grupo de referencia “EC negativo/IT≤20” y los grupos definidos por “EC positivo/IT≤20” ($p<0,0001$) y “EC positivo/IT>20” ($p<0,0001$). Las diferencias también fueron significativas entre el grupo “EC negativo/IT>20” y los grupos definidos por “EC positivo/IT≤20” ($p<0,0001$) y “EC positivo/IT>20” ($p<0,0001$). Para el resto de agrupaciones las diferencias no fueron significativas.

En el caso del FR (Tabla 36 y figura 54), las diferencias encontradas se apreciaron entre el grupo “EC negativo/IT≤20” con los grupos “EC positivo/IT≤20” ($p<0,0001$) y “EC positivo/IT>20” ($p<0,0001$) y entre el grupo “EC negativo/IT>20” con “EC positivo/IT>20” ($p<0,03$). Para la combinación “EC negativo/IT>20” con “EC positivo/IT≤20” se obtuvo una significación marginal ($p=0,06$).

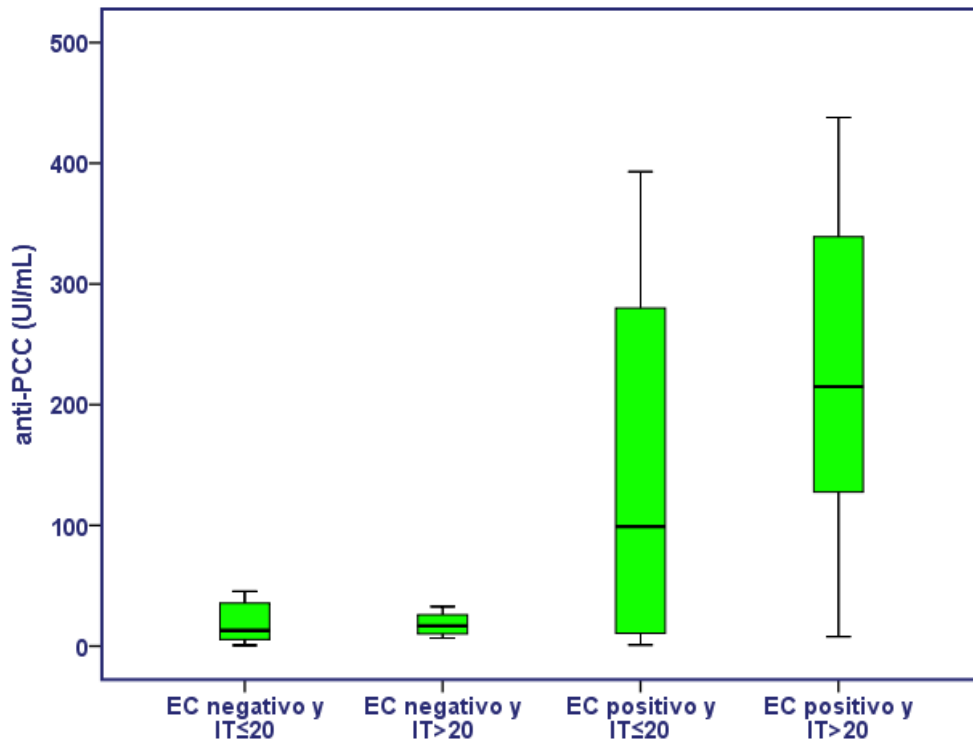


Figura 53. Niveles de anti-CCP (U/mL) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido e índice de tabaquismo.

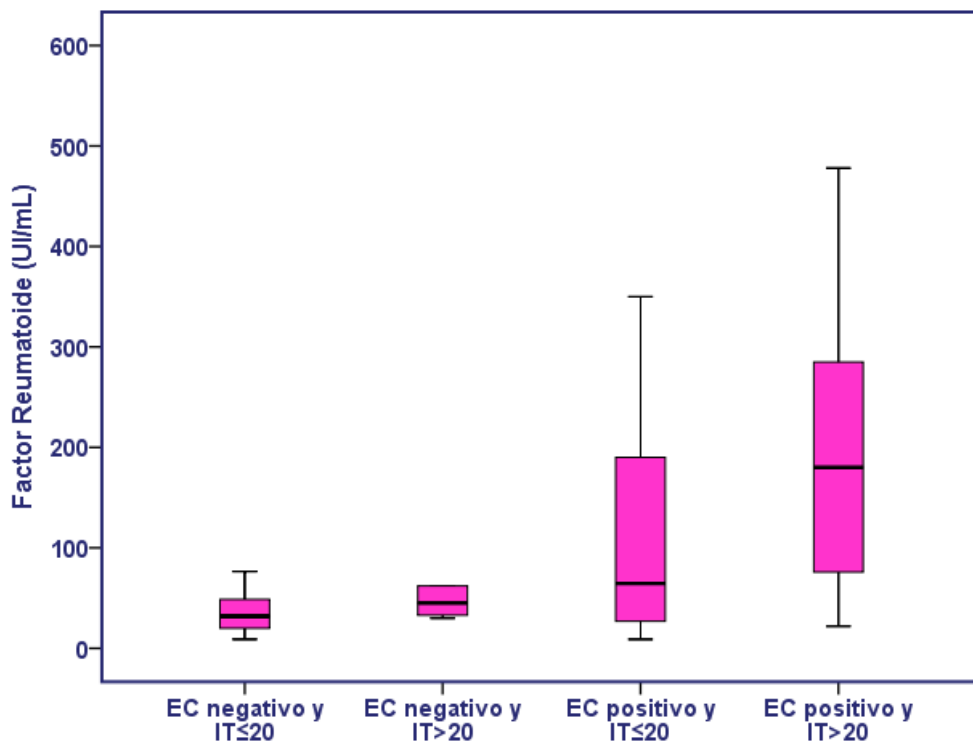


Figura 54. Niveles de FR (UI/ml) en los pacientes con AR según las combinaciones de las variables epitopo compartido e índice de tabaquismo.

En el contexto de los resultados expuestos, con esta primera aproximación se aprecia una posible interacción entre el hábito tabáquico y el EC y entre el índice de tabaquismo y el EC sobre los títulos de anticuerpos anti-CCP y FR y por lo tanto, sobre el grado de respuesta de inmunidad humoral adaptativa específica para la AR. De este modo, con estos resultados se planteó un modelo lineal general univariante (Tabla 37) para ver cuáles eran los factores independientes que podrían influir en los niveles séricos de anti-CCP y FR. Para los niveles de anticuerpos anti-CCP se observaron diferencias estadísticamente significativas para el EC ($p=0,002$), el índice de tabaquismo ($p=0,03$) y la interacción epitopo compartido-índice de tabaquismo ($p=0,03$). En cuanto a la significación práctica del modelo, éste presentó un coeficiente Eta^2 del 32% lo que indica que los factores incluidos en el modelo explican el 32% de la variable dependiente (niveles séricos de anti-CCP). Dentro del modelo, el EC explicó el 40% de la varianza de los niveles de anti-CCP mientras que el índice de tabaquismo y la interacción entre ambos factores explicaron el 68% y 30% de la variable dependiente, respectivamente.

	Coefficiente Eta^2 (%)	Potencia	Valor p
Modelo 1: Anti-CCP	32	0,65	0,02
Epitopo compartido	40	0,91	0,002
Índice de tabaquismo	68	0,90	0,03
Epitopo compartido x Índice de tabaquismo	30	0,45	0,03
Edad	3	0,6	0,5
Género femenino	1	0,10	0,6
Modelo 2: Factor Reumatoide	21	0,88	0,01
Modelo	21	0,88	0,01
Epitopo compartido	12	0,86	0,003
Hábito tabáquico	1	0,13	0,3
Epitopo compartido x Hábito tabáquico	1	0,62	0,7
Género femenino	1	0,13	0,4
Edad	2	0,17	0,3

Tabla 37. Modelo lineal general univariante para el estudio de la interacción entre el epitopo compartido y el hábito tabáquico sobre los niveles de anti-CCP y de FR. Variables independientes incluidas inicialmente en el modelo: epitopo compartido, hábito tabáquico, índice de tabaquismo y las interacciones entre ellos. Variables de confusión: sexo, edad. Variable dependiente: anticuerpos anti-CCP para el modelo 1 y FR para el modelo 2.

En cuanto a los niveles de FR sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas para el EC ($p=0,003$) donde este factor explicó el 12% de la varianza de la variable dependiente presentando también una baja relevancia clínica. La significación práctica del modelo fue del 21%.

10 Valor pronóstico de los anticuerpos anti-CCP

Las características demográficas y clínicas de los 59 pacientes incluidos en el estudio se resumen en la tabla 38 para el **punto corte definido para un valor de anti-CCP de 120 U/mL** en la visita inicial. La mediana de edad de los pacientes fue de 53 (42-59) años siendo el 70% de ellos mujeres. No se encontraron diferencias significativas en la visita basal para la edad y el sexo.

Parámetros	Todos los pacientes (n=59) n (%)	Anti-CCP negativo (n=32) n (%)	Anti-CCP positivo (n=27) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género femenino	41 (70)	25 (78)	16 (59)	0,1
Erosiones articulares	42 (71)	25 (78)	17 (63)	0,2
HAQ ≥ 1	35 (59)	17 (53)	18 (67)	0,3
DAS28 $\geq 5,5$	33 (56)	18 (56)	15 (56)	0,9
Pacientes que inician tratamiento con MTX	36 (61)	15 (47)	21 (78)	0,02

Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad	53 (42-59)	52 (39-60)	54 (42-59)	0,7
FR (UI/mL)	57,6 (20-115)	34,2 (20-68,4)	85,5 (38,5-258)	0,001
PCR (mg/L)	13,3 (6,3-31,4)	11,6 (5,8-32,9)	14,7 (6,3-26-3)	0,9
VSG (mm/h)	30 (13-50)	34,5 (12,45,5)	29 (13-54)	0,7
NAI	11 (4-16)	11 (4-15)	11 (4-17)	0,6
NAD	15 (4-20)	12 (4-21)	16 (4-20)	0,7
HAQ	1,35 (0,5-2)	1,26 (0,68-1,94)	1,38 (0,5-2)	0,8
DAS28	5,7 (4,2-6,7)	5,7 (4,3-6,7)	5,7 (4,0-6,7)	0,9

Tabla 38. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para los anticuerpos anti-CCP (punto de corte de 120 U/mL). Las variables están expresadas como proporciones n (%) y valores de mediana (IQR) ya sean cualitativas o cuantitativas, respectivamente. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con anti-CCP negativo (≤ 120 U/mL) y anti-CCP positivo (> 120 U/mL). ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

El **daño radiológico** de los pacientes se evaluó mediante la presencia de **erosiones articulares en las radiografías anteroposteriores de manos y pies**. Las erosiones articulares óseas se observaron en el 71% de los pacientes en la visita basal pero las diferencias no fueron significativas entre pacientes con anti-CCP positivo y negativo (63% y 78% respectivamente) Del mismo modo, las diferencias tampoco fueron significativas para la presencia de un marcador de actividad DAS28 \geq 5,5 y una puntuación en el cuestionario de discapacidad HAQ $>$ 1 según la positividad para los anti-CCP. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes que iniciaron terapia con MTX siendo del 47% en pacientes con anti-CCP negativos frente a un 78% en aquellos con anti-CCP positivos ($p=0,02$).

Los niveles de anti-CCP en la visita inicial fueron de 114 (26-247) U/mL para todos los pacientes incluidos en el seguimiento, positivos en el 46% de ellos. Su valor fue de 255 (205,4-332,5) U/mL en el grupo con anti-CCP positivos mientras que en el grupo con anti-CCP negativo fue de 36,5 (6,0-70,8) U/mL. En relación a las variables cuantitativas sólo se observaron diferencias significativas para los niveles de FR ($p=0,001$) y no para el resto de parámetros: PCR, VSG, DAS28, HAQ, NAI y NAD. Durante el seguimiento de los pacientes, aquellos que presentaban los anti-CCP negativo presentaron un mayor porcentaje de erosiones articulares que se igualó para ambos grupos a los 36 meses. No obstante, las diferencias entre grupos no fueron significativas (Figura 53).

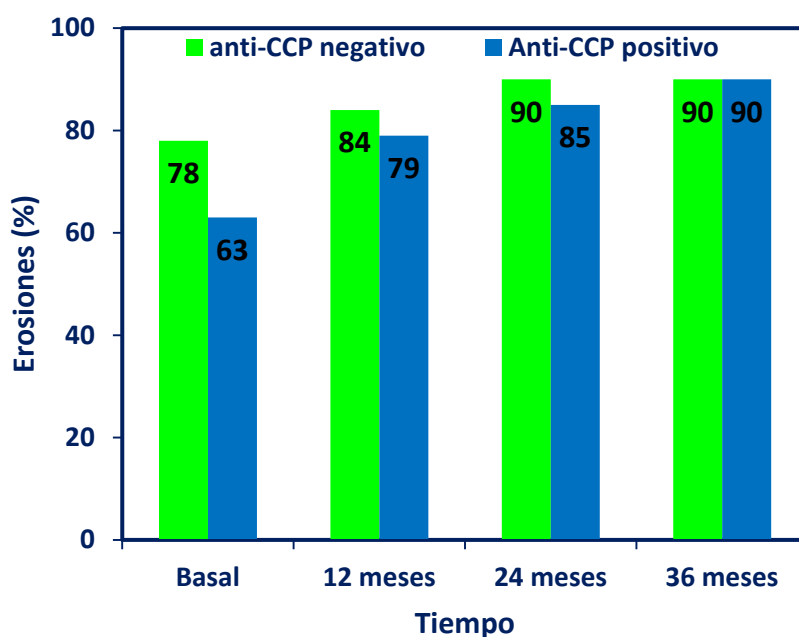


Figura 53. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento. Las barras representan el porcentaje de sujetos que presentan erosiones articulares en los grupos con anti-CCP negativo (\leq 120 U/mL) y anti-CCP positivo ($>$ 120 U/mL).

La actividad de la enfermedad medida por la puntuación DAS28 (Figura 54) fue similar para los pacientes con y sin anti-CCP positivos en la visita basal. Así, el DAS28 fue de 5,7 (4,0-6,7) para los pacientes con anti-CCP positivos y de 5,7 (4,3-6,7) para los pacientes con anti-CCP negativos. En los pacientes con anti-CCP positivos; el DAS28 descendió significativamente desde el valor inicial de 5,7 (4,0-6,7) en la visita basal a niveles de 3,7 (2,8-4,7), 3,4 (2,6-4,5) y aumentó a 3,7 (2,5-4,2) a los 12, 24 y 36 meses de seguimiento respectivamente ($p=0,001$). Para aquellos con anti-CCP negativos, la evolución fue desde un valor inicial de 5,7 (4,3-6,7) a niveles de 3,4 (2,1-4,9), 2,9 (1,8-3,6) y 2,5 (2,0-3,3) respectivamente ($p<0,0001$).

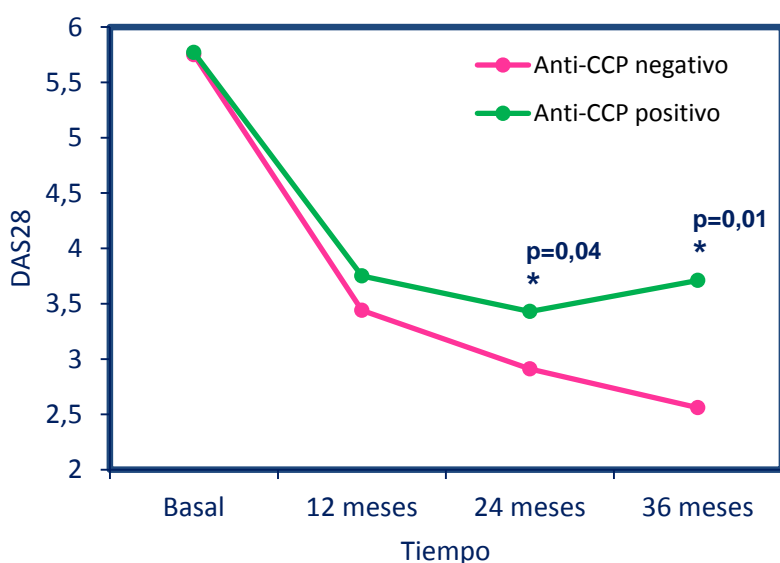


Figura 54. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 120 U/mL. * Diferencias estadísticamente significativas encontradas entre grupos con anti-CCP positivo y negativo.

Los pacientes con anti-CCP positivos presentaron valores más altos de la puntuación DAS28 que aquellos con anti-CCP negativos. Aunque la puntuación del DAS28 descendió significativamente tanto en los pacientes positivos como negativos para los anti-CCP; las diferencias encontradas entre grupos de pacientes con anti-CCP positivos y negativos sólo fueron significativas a los 24 (3,4 vs. 2,9) y 36 meses (3,7 vs. 2,5) con una significación de $p=0,04$ y $p=0,01$ respectivamente.

Al igual que ocurre con el DAS28; en la visita basal el cuestionario de discapacidad HAQ presentó valores similares para los pacientes con anti-CCP positivos y negativos siendo de 1,38 (0,5-2,0) y 1,26 (0,68-1,94) respectivamente. Durante la evolución a lo largo del tiempo (Figura 55), en los pacientes con anti-CCP

positivos el valor del índice HAQ disminuyó continuamente hasta los 24 meses tras lo que aumentó ligeramente a los 36 meses ($p=0,01$).

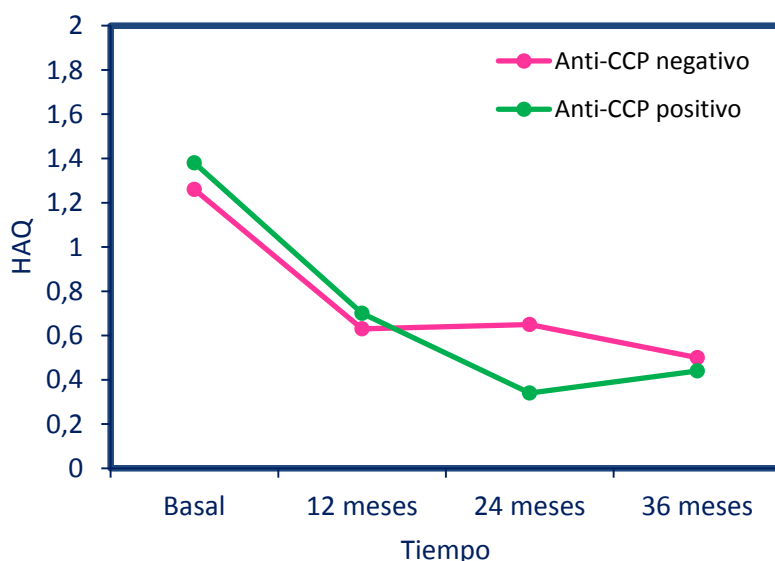


Figura 55. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 120 U/mL.

Sin embargo, en los pacientes con anti-CCP negativos, los valores disminuyeron hasta los 12 meses, permanecieron constante hasta los 24 meses y descendieron levemente a los 36 meses ($p=0,001$). A los 24 y 36 meses, los valores del HAQ fueron superiores en los pacientes con anti-CCP negativos frente a los que tenían anti-CCP positivos. Las diferencias a lo largo del tiempo del índice HAQ entre los grupos con anti-CCP positivos y negativos no fueron significativas.

En la tabla 39 se encuentran los datos relativos al seguimiento de los pacientes para las erosiones articulares, DAS28 y HAQ. Del mismo modo que como se ha procedido para el punto de corte de 120 U/mL; el análisis de los datos con el **punto de corte 40 U/mL** para los anti-CCP fue similar pero sin encontrarse significación alguna entre grupos con anti-CCP positivo y negativo. Los resultados obtenidos se encuentran en el **Anexo 7**.

Parámetros	Anti-CCP negativo (n=32)	Anti-CCP positivo (n=27)	
Erosiones	n (%)	n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Visita basal	25 (78)	17 (63)	0,2
12 meses	27 (84)	21 (79)	0,5
24 meses	29 (90)	23 (85)	0,5
36 meses	29 (90)	24 (90)	0,8
DAS28	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	5,7 (4,3-6,7)	5,7 (4,0-6,7)	0,7
12 meses	3,4 (2,1-4,9)	3,7 (2,8-4,7)	0,1
24 meses	2,9 (1,8-3,6)	3,4 (2,6-4,5)	0,04
36 meses	2,5 (2,0-3,3)	3,7 (2,5-4,1)	0,01
HAQ	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	1,26 (0,68-1,94)	1,38 (0,5-2,0)	0,8
12 meses	0,63 (0,0-1,59)	0,70 (0,3-1,38)	0,6
24 meses	0,65 (0,13-1,5)	0,34 (0,13-1,5)	0,9
36 meses	0,50 (0,0-1,23)	0,44 (0,13-1,35)	0,6

Tabla 39. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 120 U/mL) y con anti-CCP positivo (>120 U/mL) durante los 3 años de seguimiento. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico para un punto de corte de 120 U/mL. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con anti-CCP negativo y anti-CCP positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

11

Valor pronóstico del Factor Reumatoide

En la visita basal, el 47% de los pacientes presentaba el **FR positivo con niveles superiores a 60 UI/mL** mientras que para el 53% restante era negativo. La mediana de los niveles de FR en los pacientes con FR positivo fue de 128 (85-243) UI/mL mientras que en el grupo con FR negativo fue de 22 (20-35,5) UI/mL. En la tabla 40 se presentan los datos de los pacientes según la positividad para el FR. No se observaron diferencias significativas para la edad y el sexo entre ambos grupos.

Se observó un mayor porcentaje de pacientes con una puntuación HAQ>1 en el grupo con FR positivo (p=0,02). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la presencia de erosiones articulares, la actividad elevada de la enfermedad definida por un DAS28≥5,5 y el porcentaje de pacientes que inician terapia con MTX.

Parámetros	Todos los pacientes (N=59) n (%)	FR negativo (n=31) n (%)	FR positivo (n=28) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género femenino	41 (70)	24 (77)	17 (60)	0,1
Erosiones articulares	42 (71)	22 (71)	20 (71)	0,9
HAQ ≥1	35 (59)	14 (45)	21 (75)	0,02
DAS28 ≥5,5	33 (56)	16 (52)	17 (61)	0,4
Pacientes que inician tratamiento con MTX	36 (61)	16 (52)	20 (71)	0,2

Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad	53 (42-59)	50 (34-59)	55 (46-60)	0,2
Anti-CCP (U/mL)	114 (26-247)	45 (8,5-185)	205 (78,5-294,5)	0,009
PCR (mg/L)	13,3 (6,3-31,4)	12,1 (5,7-32,9)	14,3 (7,1-28,1)	0,8
VSG (mm/h)	30 (13-50)	25 (12-42)	33 (21-52)	0,3
NAI	11 (4-16)	10 (4-16)	12 (6-16)	0,6
NAD	15 (4-20)	11 (4-18)	15 (4-23)	0,7
HAQ	1,35 (0,5-2)	1 (0,34-2,16)	1,6 (1,1-1,84)	0,3
DAS28	5,7 (4,1-6,6)	5,5 (4,1-6,6)	5,9 (4,7-6,6)	0,5

Tabla 40. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para el FR (punto de corte de 60 UI/mL). Las variables están expresadas como proporciones n (%) y valores de mediana (IQR) ya sean cualitativas o cuantitativas, respectivamente. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con FR negativo (≤60 UI/mL) y FR positivo (>60 UI/mL). ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Los pacientes con FR positivo presentaban niveles superiores de anti-CCP con una mediana de 205 (78,5-294,5) U/mL frente a aquellos con FR negativo donde los niveles eran de 45 (8,5-185) U/mL. No se observaron diferencias significativas en el resto de variables cuantitativas: PCR, VSG, NAI, NAD, HAQ y DAS28.

En relación al daño articular, ambos grupos de pacientes presentaron el mismo porcentaje de erosiones articulares en la visita basal (71%). Durante el seguimiento de los pacientes se observó un mayor porcentaje de pacientes con erosiones articulares en el grupo con FR positivo pero sin llegar a ser significativas las diferencias existentes (Figura 56).

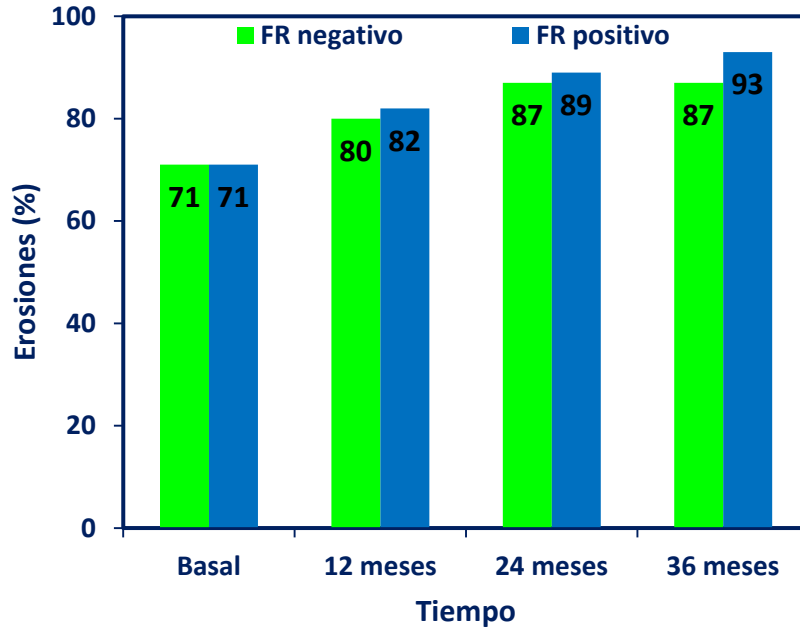


Figura 56. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento. Las barras representan el porcentaje de sujetos que presentan erosiones articulares en los grupos con FR negativo (≤ 60 UI/mL) y FR positivo (>60 UI/mL).

Para el índice de actividad DAS28 (Figura 57); en aquellos pacientes pertenecientes al grupo con FR positivo se observó una mayor actividad de la enfermedad de acuerdo al parámetro DAS28 pero las diferencias entre grupos no fueron significativas.

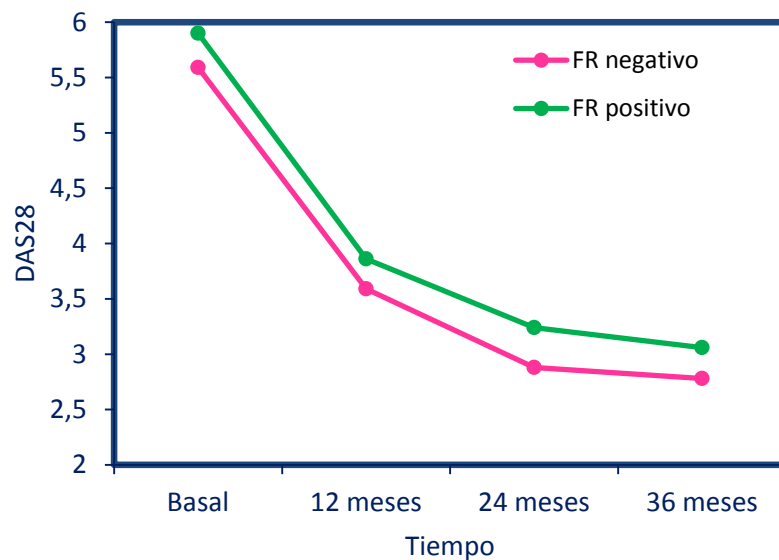


Figura 57. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (≤ 60 UI/mL) y con FR positivo (>60 UI/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 60 UI/mL.

En ambos grupos el valor de DAS28 disminuyó continuamente siendo significativa tanto para el grupo con FR positivo ($p < 0,0001$) como para el grupo con FR negativo ($p < 0,0001$). En el primer grupo disminuyó de un valor inicial de 5,9 (4,7-6,6) a un valor de 3,1 (2,2-3,7) a los 36 meses. Del mismo modo, en el grupo de pacientes con FR negativo, disminuyó desde un valor de 5,5 (4,1-6,6) hasta 2,7 (2,1-3,7).

Para el índice HAQ se observó una mayor puntuación en pacientes con FR positivo (Figura 58). En ellos, el valor inicial fue de 1,6 (1,1-1,84) y disminuyó a 1,0 (0,34-1,63) a los 12 meses permaneciendo constante a los 24 meses con un valor de 1,0 (0,25-1,50). A los 36 meses la puntuación de índice descendió hasta 0,5 (0,19-1,36). Sin embargo, para los pacientes con FR negativo, la puntuación HAQ también disminuyó pero fue más moderada con un leve incremento a los 36 meses.

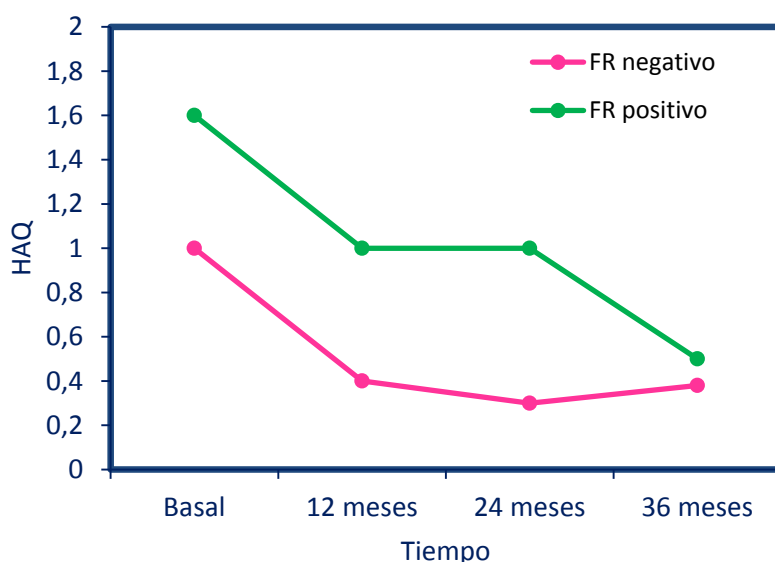


Figura 58. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (≤ 60 UI/mL) y con FR positivo (> 60 UI/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 60 UI/mL.

En la visita basal no se encontraron diferencias significativas para el HAQ entre los grupos con FR positivo y negativo y tampoco se apreciaron en los sucesivos puntos de control durante el seguimiento de los pacientes. Durante el seguimiento de los pacientes, las diferencias a lo largo del tiempo fueron significativas para los dos grupos: FR positivo ($p = 0,006$) y FR negativo ($p = 0,002$).

Los datos relativos al seguimiento de los pacientes para las erosiones articulares, DAS28 y HAQ se localizan en la tabla 41. Del mismo modo que como se ha procedido para el punto de corte de 60 UI/mL; el análisis de los datos con el **punto de corte 20 UI/mL** para el FR mostró resultados similares sin encontrarse significación alguna entre grupos con FR positivo y negativo. Los resultados se encuentran en el **Anexo 7**.

Parámetros	FR negativo (n=31)	FR positivo (n=28)	
Erosiones	n (%)	n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Visita basal	22 (71)	20 (71)	0,9
12 meses	25 (80)	23 (82)	0,8
24 meses	27 (87)	25 (89)	0,7
36 meses	27 (87)	26 (93)	0,5
DAS28	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	5,5 (4,1-6,6)	5,9 (4,7-6,6)	0,5
12 meses	3,5 (2,1-4,5)	3,8 (2,8-4,9)	0,1
24 meses	2,8 (2,1-4,1)	3,2 (2,4-4,1)	0,4
36 meses	2,7 (2,1-3,7)	3,1 (2,2-3,7)	0,5
HAQ	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	1 (0,34-2,16)	1,6 (1,1-1,84)	0,2
12 meses	0,4 (0,06-1,4)	1,0 (0,34-1,63)	0,1
24 meses	0,3 (0,13-1,31)	1,0 (0,25-1,50)	0,3
36 meses	0,38 (0,06-1,23)	0,5 (0,19-1,36)	0,3

Tabla 41. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con FR negativo (≤ 60 UI/mL) y con FR positivo (> 60 UI/mL) durante los 3 años de seguimiento. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico para un punto de corte de 60 UI/mL. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con FR negativo y FR positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

En la visita basal, treinta y ocho (64%) de los 59 pacientes con AR incluidos en el seguimiento tenían el EC positivo. Según la agrupación basada en el EC; no se encontraron diferencias significativas en el género y edad de los pacientes (Tabla 42). Los parámetros clínicos de la enfermedad DAS28 y erosiones articulares no difieren según el EC. Sin embargo, para un índice HAQ>1 se observó una significación estadística marginal ($p=0,05$). No obstante, al igual que ocurrió con los anti-CCP, hubo un mayor grupo de pacientes con EC positivo que empezaron terapia basada en MTX ($p=0,03$).

Parámetros	Todos los pacientes (n=59) n (%)	EC negativo (n=21) n (%)	EC positivo (n=38) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género femenino	41 (70)	15 (71)	26 (68)	0,8
Erosiones articulares	42 (71)	17 (81)	25 (66)	0,2
HAQ ≥ 1	35 (59)	9 (43)	26 (68)	0,05
DAS28 $\geq 5,5$	33 (56)	12 (57)	21 (55)	0,9
Inicio terapia con MTX	36 (61)	9 (42)	27 (71)	0,03

Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad	53 (42-59)	50 (36-58)	55 (45-59)	0,5
Anti-CCP (U/mL)	114 (26-247)	37 (8-87)	189 (60-261)	0,02
FR (UI/mL)	57,6 (20-115)	31 (20-38,5)	76,2 (43-210)	0,001
PCR (mg/L)	13,3 (6,3-31,4)	8,67 (3,27-30,5)	15,8 (7,44-31,4)	0,2
VSG (mm/h)	30 (13-50)	22 (10-43)	33 (20-54)	0,1
NAI	11 (4-16)	9 (4-15)	12 (6-16)	0,6
NAD	15 (4-20)	9 (4-17)	15 (4-22)	0,8
HAQ	1,35 (0,5-2)	1 (0,3-1,75)	1,38 (0,88-2)	0,2
DAS28	5,7 (4,1-6,6)	5,6 (3,4-6,6)	5,8 (4,6-6,7)	0,4

Tabla 42. Características basales de los pacientes con AR estratificados según el EC. Las variables están expresadas como proporciones n (%) y valores de mediana (IQR) ya sean cualitativas o cuantitativas, respectivamente. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con EC negativo y EC positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

El EC positivo estuvo fuertemente asociado tanto con los anti-CCP ($p=0,02$) como con el FR ($p=0,001$) en la visita basal. Los pacientes con EC positivo presentaban un anti-CCP de 189 (60-261) U/mL y un FR de 76,2 (43-210) UI/mL en

comparación a aquellos con EC negativo donde dichos anticuerpos fueron de 37 (8-87) U/mL y de 31 (20-38,5) UI/mL, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas para los marcadores de inflamación (PCR y VSG) y para las variables clínicas DAS28, HAQ, NAD y NAI entre pacientes con EC positivo y negativo.

En la visita basal; se observó un mayor porcentaje de pacientes con erosiones articulares en el grupo con EC negativo (81%) frente a aquellos con EC positivo (66%). Durante el seguimiento de los pacientes, el porcentaje de pacientes con erosiones articulares fue superior en el grupo con EC negativo (Figura 59). En el grupo con EC positivo el porcentaje fue aumentando desde un valor inicial del 66% hasta alcanzar el 90% a los 36 meses. Sin embargo, las diferencias entre grupos de pacientes con EC positivo y negativo no fueron estadísticamente significativas.

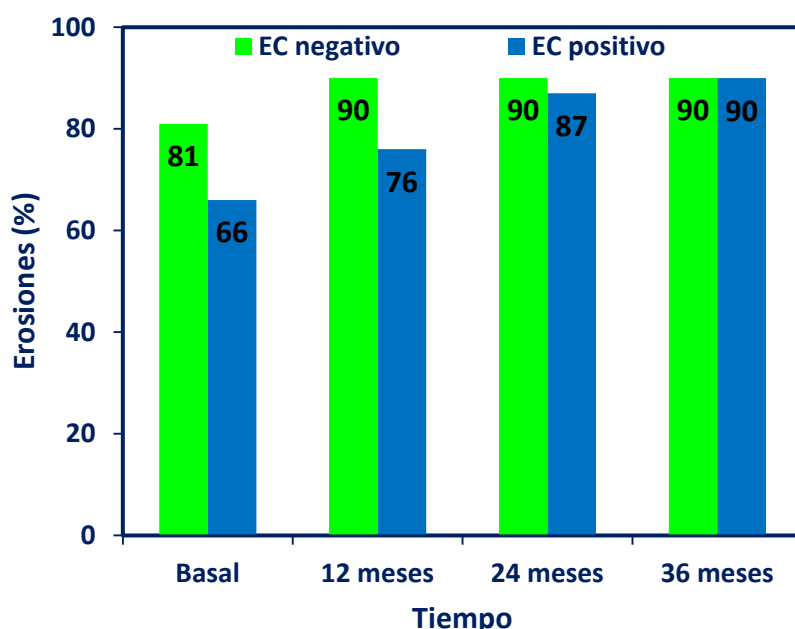


Figura 59. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento. Las barras representan el porcentaje de sujetos que presentan erosiones articulares en los grupos de pacientes con EC negativo y EC positivo.

Para el índice DAS28 se observaron valores similares entre los pacientes con EC positivo y negativo durante el seguimiento. En ambos grupos, la puntuación del DAS28 disminuyó a lo largo del tiempo de manera significativa con un nivel de significación de $p < 0,0001$ para el grupo con EC positivo y de $p = 0,004$ para el grupo con EC negativo (Figura 60).

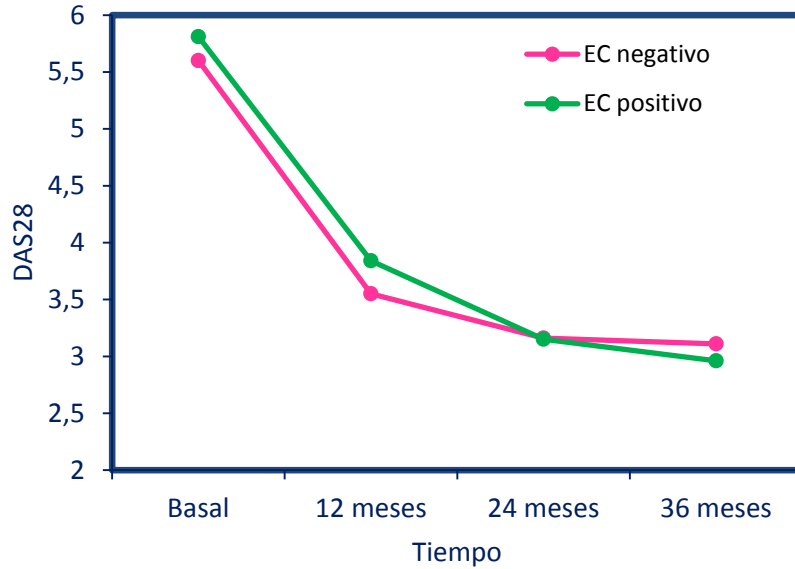


Figura 60. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con EC negativo y positivo. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el EC.

En los pacientes con EC positivo, el índice HAQ disminuyó continuamente hasta los 24 meses a partir del cual aumento hasta los 36 meses ($p < 0,0001$). Sin embargo, en los pacientes con EC negativo, el índice HAQ disminuyó hasta los 12 meses para aumentar a los 24 meses y volver a disminuir a los 36 meses ($p = 0,09$; NS) (Figura 61). Los pacientes con EC positivo y negativo no difieren significativamente en las puntuaciones DAS28 y HAQ en cualquier punto durante el seguimiento (Tabla 43).

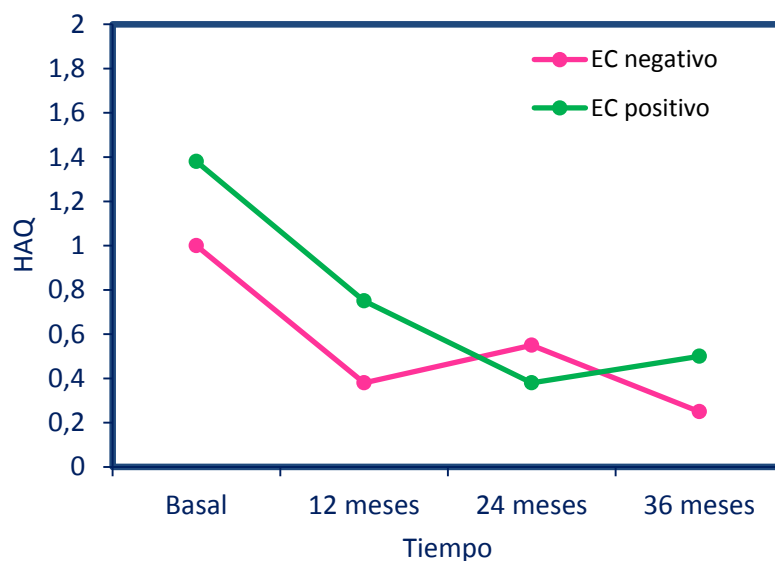


Figura 61. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con EC negativo y positivo. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el EC.

Los datos relativos al seguimiento de los pacientes para las erosiones articulares, DAS28 y HAQ se localizan en la tabla 43.

Parámetros	EC negativo (n=21)	EC positivo (n=38)	
Erosiones	n (%)	n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Visita basal	17 (81)	25 (66)	0,2
12 meses	19 (90)	29 (76)	0,2
24 meses	19 (90)	33 (87)	0,6
36 meses	19 (90)	34 (90)	0,9
DAS28	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	5,6 (3,4-6,6)	5,8 (4,6-6,7)	0,4
12 meses	3,5 (2,0-4,1)	3,8 (2,7-4,9)	0,2
24 meses	3,1 (1,9-4,1)	3,1 (2,4-4,1)	0,7
36 meses	3,1 (2,0-3,8)	2,9 (2,2-3,7)	0,9
HAQ	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	1 (0,3-1,75)	1,38 (0,88-2)	0,2
12 meses	0,38 (0,13-1,5)	0,75 (0,3-1,6)	0,3
24 meses	0,55 (0,13-1,5)	0,38 (0,13-1,5)	0,8
36 meses	0,25 (0,0-1,5)	0,5 (0,2-1,20)	0,6

Tabla 43. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con EC negativo y con EC positivo durante los 3 años de seguimiento. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con EC negativo y EC positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.



V

Discusión

La AR es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta entre el 0,5-1% de la población. La incidencia anual de la enfermedad es de 3 casos por 10.000 habitantes con una prevalencia aproximada del 1%. Su repercusión socioeconómica es muy elevada con costes directos e indirectos y alrededor del 5% de las bajas laborales en España se deben a la AR. El daño articular es responsable en gran parte de la discapacidad de estos pacientes⁴⁵².

Así, el diagnóstico precoz y, por tanto, la prevención del daño articular con el tratamiento adecuado es fundamental en los pacientes con AR. Además, la identificación de marcadores pronósticos de la enfermedad puede ayudar a modificar el curso de la enfermedad.

El presente estudio fue realizado para analizar el valor de los biomarcadores, especialmente los autoanticuerpos, en pacientes con AR. Se trata de un estudio observacional, ambispectivo, de práctica clínica diaria que incluyó tanto pacientes seguidos a través del tiempo como a un grupo de sujetos control. La muestra incluida en el presente estudio es representativa de la población que es atendida en la práctica clínica habitual en nuestra área hospitalaria y que acuden a las consulta de artritis precoz con sospecha de AR del Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla.

En este estudio se pretende reflejar la realidad del manejo clínico de los pacientes con artritis precoz y que acuden a las consultas especializadas con sospecha de AR. En la consulta de artritis precoz se obtuvo una prevalencia de AR del 50%. Sin embargo, este valor es muy superior a la prevalencia de la AR en la población de España, situada en el 0,5%¹. Esto se debe a que son dos situaciones distintas: por un lado la prevalencia de la enfermedad en población adulta y por otro lado, la obtenida en nuestro estudio, que refleja la realidad en una consulta especializada de artritis precoz.

Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes

Este estudio descriptivo de los pacientes con AR representa a un grupo de pacientes con características clínicas y serológicas típicas de la patología articular inflamatoria: una mayor frecuencia en el sexo femenino (72%), con una mediana de edad de 53 años, alto porcentaje de pacientes con FR positivo (81%), con reactantes

de fase aguda elevados y afectación predominantemente poliarticular. De este modo, las características principales de los pacientes con AR, tanto demográficas como clínicas y serológicas, al diagnóstico son similares a otros estudios realizados en nuestra área geográfica como se encuentra recogido en la literatura científica⁴⁵³.

La mediana de edad de los pacientes con AR estudiados se sitúa en 53 (45-62) años. Este resultado se encuadra con los descritos por Carmona y cols. que señalaron que la AR es una enfermedad que aparece con más frecuencia entre la cuarta y sexta décadas de la vida¹. De igual modo, en los grupos NOAR y CONTROL hay un predominio del sexo femenino pero la edad de presentación de la enfermedad en ambos grupos fue inferior al grupo AR.

La AR es una enfermedad con una base genética conocida. Prueba de ello es que en los pacientes con AR, el 21% de ellos declararon que tenían familiares afectados por dicha enfermedad. Castañeda y cols. encontraron que el 12% de los pacientes con AR precoz tenían antecedentes familiares de AR mientras que en los pacientes con AR establecida este porcentaje descendió al 7%⁴⁵⁴. Al igual que nuestro estudio, este trabajo se realizó en condiciones de práctica clínica habitual pero en todo el territorio español mientras que el nuestro fue en un área geográfica concreta del sur de España. Esta variabilidad en el porcentaje de pacientes con familiares afectados de AR entre los dos estudios puede ser debido a influencia de distintos factores ambientales y también porque pueden existir sesgos de memoria debido a que algunos pacientes pueden ser imprecisos en la información suministrada.

Destaca que estos pacientes, tanto AR como NOAR, son atendidos por el reumatólogo, en el 83% y 87% de los casos respectivamente, en un tiempo inferior a dos años desde la aparición de los primeros síntomas. De ello se deduce que los pacientes presentaron un diagnóstico precoz de la enfermedad. Este tiempo se ha reducido de más de 4 años en el periodo 2001-2002 a menos de dos en la fecha en que se realizó el estudio y representa un claro avance en la estrategia T2T (*Treat to Target*) del tratamiento de la enfermedad. Esta estrategia T2T propone que la meta terapéutica en AR debería ser la remisión clínica o en su defecto, un estado de bajo nivel de actividad. La reducción en el tiempo se debe principalmente a la creación de las consultas especializadas de artritis precoz que están enfocadas a pacientes que presentan artritis de inicio en atención primaria, como una vía de derivación rápida y fácil en la que el tiempo entre que se manifiesta la artritis y es reconocida por el médico de atención primaria hasta que lo ve el reumatólogo debe ser menor de dos

meses. El tiempo en que el reumatólogo inicia el tratamiento y establece el diagnóstico no debe superar las seis semanas. Además, esta derivación a las consultas de artritis precoz en el menor tiempo posible es fundamental para instaurar un tratamiento precoz con FARMES en pacientes con AR para prevenir el daño articular irreversible que se produce en las primeras etapas de la enfermedad, de acuerdo con la estrategia T2T y los actuales protocolos de actuación vigentes.

En nuestro estudio, el 78% de los pacientes con AR cumplieron los criterios de clasificación ACR de 1987. Si comparamos nuestros resultados con un estudio reciente sobre el manejo de la AR en España⁴⁵⁵, en dicho estudio este porcentaje ascendió a un 94%. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con erosiones articulares entre ambos estudios fue similar con presencia de erosiones en el 60% de los pacientes de nuestro estudio y en el 59% de los pacientes del estudio español, proporción importante de pacientes con enfermedad erosiva.

Un inconveniente que tenemos que tener en cuenta son los comentados sesgos de memoria a la hora de definir el inicio de los síntomas por parte de los pacientes. En base a ello y debido a alto porcentaje de pacientes con erosiones articulares (60%), podemos considerar que dentro del grupo de pacientes con AR que presentaron un diagnóstico precoz (83%) puede que haya un porcentaje de ellos donde el diagnóstico no haya sido tan precoz como han referido en las consultas a la hora de describir el comienzo de los síntomas. Esto es particularmente cierto cuando los pacientes tienen un inicio insidioso o tipo palindrómico de la enfermedad.

El porcentaje de pacientes con manifestaciones extraarticulares fue similar en los dos estudios, encontrándose en el 21% y en el 24% de los pacientes, respectivamente⁴⁵⁵. Las manifestaciones más frecuentes que encontramos fueron el SS en el 8% de los pacientes con AR y los nódulos reumatoides presentes en el 6% de ellos. Los resultados obtenidos están de acuerdo con estudios previos donde las manifestaciones extraarticulares predominantes fueron los nódulos reumatoides y el SS. Cabe destacar que en un estudio realizado en 15 países europeos se observa una variación en la prevalencia de las manifestaciones extraarticulares siendo del 15% (Holanda, Italia) al 30% (Alemania, Gran Bretaña, Dinamarca y Polonia) con un 23% para España⁴⁵⁶.

También encontramos un porcentaje de pacientes que presentaron xeroftalmia o xerostomía sin diagnóstico clínico de SS al momento del estudio. En el grupo NOAR,

la presencia de manifestaciones extraarticulares fue inferior en porcentaje y se limitaba a SS, xeroftalmia o xerostomía. Se puede considerar que existe cierto sesgo en la búsqueda de manifestaciones extraarticulares de forma minuciosa en la consulta de artritis precoz.

Los hallazgos clínicos encontrados en el presente estudio, significativamente más alterados para los pacientes con AR en relación al grupo NOAR, excepto el dolor articular nocturno y la evaluación del dolor, son consistentes con lo reportado por varios autores^{450,451}. Con relación a la actividad y compromiso funcional, los pacientes con AR mostraron niveles elevados de DAS28 y una discapacidad funcional moderada evidenciado por una puntuación de DAS28 de 5,2 y un HAQ de 1,3 en comparación al grupo NOAR donde estas puntuaciones fueron de 3,1 y 0,1 respectivamente. El DAS28 de los pacientes con AR al diagnóstico fue idéntico al obtenido por Blanco y cols. en un estudio descriptivo de pacientes con AR en España⁴⁵⁰.

Un dato interesante es que el 51% de los pacientes con AR presentó un índice $DAS28 \geq 5,5$ reflejo de una elevada actividad articular y que se encuentra en consonancia con el alto porcentaje de pacientes con erosiones articulares al diagnóstico. Junto a estos hallazgos, los pacientes con AR se caracterizan por presentar al diagnóstico una mediana de 10 articulaciones inflamadas y de 10 articulaciones dolorosas con una rigidez matutina positiva en el 50% de casos y refiriendo una duración de 45 minutos. Estos resultados obtenidos para las variables clínicas en los pacientes con AR están en concordancia con un estudio multicéntrico realizado en España en 34 Servicios de Reumatología donde se estudiaron las variables sociodemográficas y clínicas de los pacientes⁴⁵¹. Nuestros resultados son un reflejo de la situación de la AR en nuestra área e indican que no es tan benigna como se consideraba en un principio con un alto porcentaje de pacientes con erosiones articulares en la visita inicial.

En relación a las variables bioquímicas de los sujetos, en nuestro estudio hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de anticuerpos, anti-CCP y FR, entre pacientes AR, NOAR y el grupo CONTROL (Tabla 19). Los pacientes con AR presentaron niveles más altos que los grupos NOAR y CONTROL.

De los 106 pacientes con AR, el 65% de ellos presentaron los anti-CCP positivos mientras que el 86% presentaron el FR positivo. La presencia de ambos

anticuerpos estuvo fuertemente asociado con la AR. Ninguno de los sujetos del grupo control presentaron valores elevados de anti-CCP mientras que el FR estuvo elevado en el 10% de los sujetos control, a títulos muy bajos, menos de 2xDE del límite superior. Resultados similares fueron reportados por Low y cols. y Sockalingam y cols. donde los anti-CCP fueron negativos en los individuos control^{457,458}. Sin embargo, Payet y cols. señalaron recientemente que aunque los anti-CCP son anticuerpos específicos de la AR, pueden observarse en otras enfermedades reumáticas inflamatorias como la PSA pero en un bajo porcentaje de pacientes⁴⁵⁹.

Estos estudios, junto con nuestro análisis, reflejan la variabilidad respecto a la frecuencia de anticuerpos en distintas regiones del mundo, lo cual estaría relacionado con la presencia de factores genéticos y ambientales particulares en cada población. Junto a los anticuerpos, en los pacientes con AR encontramos un aumento significativo de los marcadores de inflamación sistémicos PCR y VSG. Este hallazgo es similar al reportado en estudios previos^{460,461}. Esta variabilidad es también la responsable de las diferencias en las manifestaciones clínicas ya comentadas.

Aunque los ANAs están presentes en un 25-30% de los pacientes con AR, la presencia de estos anticuerpos no figura entre los criterios de la ACR/EULAR del año 2010 para la clasificación de la AR^{17,462} debido a su pobre sensibilidad y especificidad diagnóstica. En nuestro estudio, los ANAs estuvieron presentes en el 29% de los pacientes con AR. Los resultados obtenidos señalan que la detección de ANAs en los pacientes con AR nos obligaría a descartar la existencia de un SS o de un LES dada la posibilidad de un síndrome de solapamiento y la dificultad de establecer uno u otro diagnóstico en algunos pacientes con enfermedad de reciente inicio.

En los pacientes del grupo NOAR, con resultados negativos o positivos débiles de los anti-CCP, FR o ambos, es útil la valoración de los ANAs y de sus antígenos específicos para realizar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades autoinmunes sistémicas como LES, SS, esclerodermia y los comentados síndromes de superposición. Estos hallazgos son de enorme utilidad clínica y permiten al reumatólogo orientar de modo diferente el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los enfermos con patología autoinmune.

La asociación entre la AR y el EC se ha constatado en múltiples estudios desde su primera descripción por Gregersen y cols. en el año 1987 cuando estableció la

“Hipótesis del EC”⁵⁸. Respecto al análisis de los alelos implicados en la enfermedad, concretamente el EC HLA-DRB1, se encontró una mayor frecuencia en el grupo AR en relación los grupos NOAR y CONTROL. La prevalencia que hemos encontrado en los pacientes con AR es del 73%, ligeramente superior a la obtenida por Pascual y cols. en un estudio realizado en Granada en una muestra de 160 pacientes y donde apreciaron una prevalencia del 60% (IC95% 52,4-67,6%)¹⁰¹. En dicho estudio, el genotipo Negativo/Negativo apareció en un 40% de los pacientes con AR mientras que en nuestro estudio fue del 27%. En otro estudio realizado en el área norte de España, en una cohorte de 187 pacientes con AR y donde estudiaron la relación entre EC, inflamación y eventos cardiovasculares, encontraron una prevalencia del 67% (IC95% 64-70%) y más próxima al resultado obtenido por nosotros⁴⁶³. Estas diferencias pueden provenir de sesgos de selección de pacientes estudiados: población general, consultas de atención primaria, consultas de pacientes con artritis o consultas de reumatología de hospitales de tercer nivel que agrupan casos muy graves de la enfermedad.

En el estudio de Pascual y cols.¹⁰¹ el genotipo más frecuente entre los pacientes fue el DRB1*01(10)/Negativo, grupo donde ellos englobaron conjuntamente los dos genotipos DRB1*01 y DRB1*10. El porcentaje de los pacientes con al menos un alelo DRB1*01(10) en su genotipo fue del 36%, con un alelo DRB1*04 un 30% y de un 6,3% para la combinación DRB1*01(10)/DRB1*04. Si comparamos esos resultados con nuestros pacientes con AR; el porcentaje de pacientes con un alelo DRB1*01 fue del 26%, con un alelo DRB1*04 del 40% y con combinaciones DRB1*01/DRB1*04 fue del 7%. Al contrario que en dicho estudio, el genotipo más frecuente fue DRB1*04 mientras que el genotipo DRB1*10 no estuvo presente en nuestros pacientes con AR. Por otro lado, en los pacientes del grupo NOAR predominó el genotipo DRB1*01 mientras que en el grupo CONTROL predominó la ausencia de los genes del EC (74%).

Si atendemos a la dosis génica, la presencia de formas heterocigotas del EC fue similar en los pacientes de los grupos AR y NOAR mientras que aquellas formas que eran homocigotas predominaron en el grupo AR y estando ausentes en los sujetos CONTROL. En los pacientes con AR, los subtipos específicos de los alelos del EC HLA-DRB1 se han reportado como incrementados en determinadas poblaciones y difieren entre distintos grupos étnicos estudiados. Por ejemplo, en las poblaciones de ascendencia europea, los alelos DRB1*0401, DRB1*0404 y DRB1*0101 son los más

comunes asociados con la AR mientras que el alelo DRB1*0405 predomina en poblaciones asiáticas y el alelo DRB1*1402 en los indios Yakima^{65,68,71,445}.

Una limitación que hemos encontrado en nuestro estudio del EC es que el ensayo empleado determina los alelos que presenta el paciente, es decir, lo que se conoce como motivos o secuencias de aminoácidos QRRAA, QKRAA, etc. y el genotipo que presentan ya sea DR1 o DR4 pero no determinan el subtipo específico que presenta el paciente. Esto implica que un paciente con un alelo DR4-QRRAA puede presentar los subtipos DRB1*0404 o DRB1*0405 pero sin llegar a saber cuál presenta en sí. Eso impide conocer cuál es la distribución de los subtipos específicos en nuestra población como se ha realizado en la mayoría de estudios.

Los genes que codifican la severidad de la enfermedad, entre los que destacan los alelos DRB1*04 que presentan el motivo QKRAA y que juega un rol fundamental en la predisposición a la AR, tienen una menor prevalencia en España que en otros países del norte de Europa, lo que podría explicar la menor prevalencia y gravedad de la enfermedad en el sur de Europa en comparación con las poblaciones del norte^{101,464}.

No obstante, y contrariamente a esos estudios, en nuestros pacientes hemos encontrado un predominio de los alelos DRB1*04 y principalmente del motivo QKRAA ya sea su presencia en forma heterocigota o como homocigota presentes en las combinaciones DRB1*01-QRRAA/DRB1*04-QKRAA, DRB1*04-QKRAA/DRB1*04-QKRAA y DRB1*04-QKRAA/DRB1*04-QRRAA. Esta alta prevalencia de estas formas DRB1*04 se traduciría en el elevado porcentaje de erosiones articulares al diagnóstico (60%) junto al alto número de pacientes con un DAS28 \geq 5,5 en nuestro estudio (51%). En concordancia con nuestros resultados, un estudio realizado en el Reino Unido refiere la importancia de los alelos DRB1*04-QKRAA en la predisposición y severidad de la enfermedad⁴⁶⁵. Hay que señalar que los alelos DRB1*04-QKRAA estuvieron ausentes en los sujetos CONTROL mientras que en los pacientes NOAR estuvieron presentes, pero en un porcentaje muy bajo (5%) y en forma heterocigota DRB1*04-QKRAA/Negativo. Un dato interesante es que las formas homocigotas se presentaron exclusivamente en los pacientes AR excepto la combinación DRB1*QRRAA/DRB1*04-QRRAA que se dio predominantemente en el grupo NOAR.

Por otro lado, aunque España y los países europeos más meridionales presentan una alta prevalencia del hábito tabáquico, es necesaria su interacción con otros factores como el EC para activar la citrulinización de proteínas y la posterior aparición de AR^{235,257}. En este estudio se observó que aunque el hábito tabáquico fue similar en los tres grupos estudiados, en el grupo AR se observó un mayor porcentaje de pacientes con un IT elevado, y por lo tanto, niveles más altos de dicha variable. Es interesante señalar que los pacientes con AR y ex fumadores presentaron niveles más altos del IT que los que eran fumadores activos.

Asociación entre los anticuerpos anti-CCP y FR

El número total de pacientes con AR que presentaron positivos los anti-CCP y FR simultáneos fueron de 64 (60%). El diagnóstico de la AR seronegativa, referida al FR, era tradicionalmente un desafío diagnóstico ya que muchos pacientes podrían ser erróneamente clasificados como artritis viral, reactiva, cristalina o psoriásica. En nuestro estudio hemos obtenido que aunque entre ambos anticuerpos existió una buena asociación, los anti-CCP fueron positivos sólo en el 5% de los pacientes con FR negativos mientras que el FR fue positivo en el 21% de los pacientes con anti-CCP negativos (Tabla 20). Este resultado ayuda a confirmar la hipótesis de que anti-CCP y FR son anticuerpos distintos asociados a la enfermedad, con etiopatogenia diferente y que definirían distintas entidades clínicas²³⁶.

Muchas enfermedades autoinmunes o reumáticas presentan síntomas clínicos comunes a la AR como artritis poliarticular y simétrica con presencia de FR positivo que mimetizan a la AR. Dentro de estas enfermedades encontramos al LES, PSA, PMR, reumatismo palindrómico o artropatía asociada al VIH. En nuestro estudio, los pacientes del grupo NOAR presentaron los anti-CCP negativos excepto 4 de ellos (4%) mientras que el FR fue positivo en 25 pacientes (24%). Ambos anticuerpos fueron negativos en el 76% de estos pacientes. Estos resultados resaltan que los anti-CCP son útiles para distinguir la AR de otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares donde el FR sería poco útil o el diagnóstico puede ser incierto proporcionando un valor añadido al diagnóstico. Estos datos se encuentran en consenso con diversos estudios realizados^{354,466-468}.

En este contexto, un buen biomarcador de la enfermedad debería de ser detectado lo más precoz como fuese posible en el curso de la enfermedad. En este estudio, los 4 pacientes en el grupo NOAR que presentaron los anti-CCP positivos y

que fueron diagnosticados de AI al no cumplir criterios de clasificación de AR, una vez finalizado el estudio, terminaron cumpliendo los criterios de AR. Este hecho pone de manifiesto la capacidad pronóstica de los anti-CCP en pacientes con AI a la hora de predecir el desarrollo de AR.

No obstante, sería interesante realizar el seguimiento de los pacientes con AI del estudio para ver cuantos evolucionan a lo largo del tiempo a AR. De esta manera, podríamos valorar el papel pronóstico de los anti-CCP y el FR en la progresión a AR. Se ha demostrado que la presencia de anti-CCP es un factor pronóstico para el futuro desarrollo de AR^{469,470}. Estos anticuerpos pueden aparecer en el suero de los pacientes varios años antes del desarrollo de la AR ya que el desencadenante inicial para su desarrollo puede ocurrir mucho antes de la aparición de los primeros síntomas³¹⁰.

De este modo, la monitorización de los anti-CCP en pacientes con un riesgo elevado de desarrollar AR, nos podría ayudar a seleccionar sujetos en los que dichos anticuerpos se estén elevando a lo largo del tiempo para que se puedan beneficiar de un tratamiento precoz. Como consecuencia de ello, se conseguiría una reducción importante del tiempo desde la primera visita al reumatólogo y el comienzo de la intervención terapéutica lo cual se traduciría en una disminución del daño articular. Este tiempo es lo que se conoce tradicionalmente como ventana de intervención terapéutica. En este contexto, los anti-CCP presentarían un valor adicional como herramienta predictiva en el manejo de la enfermedad⁴⁷¹.

Por último, los anti-CCP no fueron positivos en ningún sujeto del grupo CONTROL pero el FR fue positivo en 7 sujetos. La ausencia de los anti-CCP en los individuos sanos y en las enfermedades del grupo NOAR (excepto los 4 casos con AI) nos confirma su alta asociación con la AR. Aunque la valoración clínica de los pacientes es fundamental, el empleo de los anticuerpos asociados a la enfermedad nos ayudaría a diagnosticar a pacientes con manifestaciones clínicas similares en AR u otras patológicas autoinmunes.

Valor diagnóstico de los biomarcadores en una consulta de Atención Primaria

Dentro de la población de pacientes estudiada y que acudió a la consulta de artritis precoz, el 50% de ellos presentó otro diagnóstico distinto de AR constituyendo el grupo NOAR lo que es un porcentaje no despreciable de pacientes que son

derivados a dicha consulta pero que deberían ser previamente derivados a otras consultas monográficas de enfermedades sistémicas, artropatías, etc. Por ello es importante, estudiar no sólo el valor de los marcadores bioquímicos en una consulta de artritis precoz, donde van a acudir pacientes AR y NOAR y que constituye la base de nuestro estudio, sino también en una consulta de atención primaria. En nuestro caso, está formada por los dos grupos anteriores de pacientes (AR y NOAR) junto a un grupo CONTROL como representación conjunta de todos ellos en dicha consulta.

El diagnóstico de la AR es clínico pero se apoya en las pruebas del laboratorio sobre todo en etapas muy tempranas de la enfermedad donde los cambios radiológicos específicos de la enfermedad como las erosiones articulares no llegan a ser evidentes. De esta manera, con los biomarcadores se consigue una mayor precisión en la identificación de pacientes y un tratamiento precoz. Esto es particularmente interesante hoy en día donde el tratamiento de la enfermedad ha evolucionado con la introducción precoz de los FARMES ya sea en monoterapia o combinados con otros fármacos.

En una consulta de Atención Primaria el espectro de individuos que acuden es muy amplio: pacientes con AR, pacientes con enfermedades reumáticas distintas a la AR y sujetos que no presentan patología de origen inflamatorio y/o articular. Por ello, es fundamental que dicha consulta funcione como un filtro de cribado o tamizaje que nos permita seleccionar aquellos pacientes con sospecha clínica a fin de ser derivados a una consulta de atención especializada, para confirmar el diagnóstico de AR. Para ello, es fundamental el uso de pruebas diagnósticas que presenten una alta sensibilidad.

En las enfermedades autoinmunes, como la AR, se emplean los anticuerpos en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de los pacientes. Sin embargo, como es cierto para cualquier test de laboratorio, la interpretación de dicho test depende de la situación clínica (probabilidad pre-test), las características del test (sensibilidad, especificidad y ratios de verosimilitud) y por último, la causa de la aplicación de dicho test (confirmación o exclusión de un diagnóstico). La presencia del FR en un paciente con artritis incrementa la probabilidad de diagnóstico de AR y, en un paciente diagnosticado de AR, aumenta el riesgo de desarrollo de erosiones, manifestaciones extraarticulares y un peor pronóstico. Sin embargo, el FR también se encuentra presente en varias enfermedades autoinmunes como SS, LES, artritis idiopática juvenil y esclerosis sistémica que se pueden presentar con signos clínicos de poliartritis⁴⁷² y

más aún en muchas enfermedades no reumáticas que cursan con artritis como infecciosas, linfoproliferativas, etc.

En el presente estudio, los datos para una consulta de atención primaria, el FR presentó una sensibilidad moderada del 81% que se encuentra en concordancia con la obtenida en estudios previos^{473,474} y una especificidad idéntica del 81%. Sin embargo, para los anti-CCP la sensibilidad (66%) fue inferior al FR pero presentó una muy buena especificidad (98%). No obstante, en la revisión bibliográfica realizada se ha documentado una variación considerable en la sensibilidad diagnóstica de los anti-CCP entre diversos estudios y que oscila entre el 41-80% (Tabla 7). Entre los factores que pueden influir en dicha variabilidad incluimos el tipo de ensayo empleado ya sean anti-CCP de primera, segunda o tercera generación; el punto de corte empleado para definir un resultado positivo y que varía significativamente entre los estudios; las características clínicas de los pacientes evaluados e incluso la etnicidad de los pacientes.

Aunque los anti-CCP se han estudiado en un gran número de grupos étnicos, su patogénesis no es conocida en su totalidad. Así, algunos factores desencadenantes que estarían relacionados con el origen étnico podrían tener un efecto sobre la producción de anticuerpos en la AR y por lo tanto en la variabilidad de la sensibilidad obtenida en los estudios realizados. También hay que considerar que los anti-CCP constituyen un grupo heterogéneo de anticuerpos que van dirigidos contra distintos epítomos en las moléculas de citrulina. Por ello, el suero de cada paciente va a contener distintos tipos de anticuerpos contra péptidos y proteínas citrulinadas y que cada ensayo específico va a ir dirigido contra un antígeno específico. Por el contrario a la sensibilidad, la especificidad obtenida para los anti-CCP fue superior que para el FR. La especificidad del FR se encuentra en concordancia con estudios previos²⁹³. Para los anti-CCP existe un consenso entre los distintos estudios realizados acerca de la alta especificidad que presenta y que está comprendida entre el 95 y 100%^{475,476}. En cuanto al resto de biomarcadores (PCR y EC) presentaron una baja sensibilidad junto a una baja especificidad en el estudio por lo que no se deberían considerar prioritarios en el estudio diagnóstico de estos pacientes en una consulta de atención primaria. Esta elevada especificidad sitúa a la determinación de los anti-CCP como una valiosa prueba confirmatoria en el contexto de pacientes atendidos en consultas especializadas de reumatología.

Nuestro estudio mostró que la combinación “anti-CCP o FR” incrementó la sensibilidad al 86% y la especificidad permaneció similar al FR con un valor del 81%. Por otro lado, con las combinaciones “anti-CCP+FR” y anti-CCP+FR+PCR” la sensibilidad disminuyó en ambas combinaciones en relación al FR mientras que la especificidad aumentó a la de los anti-CCP. Esta disminución en la sensibilidad de las combinaciones es debido a que estuvo limitada por la sensibilidad de los anti-CCP. Sin embargo, el uso combinado de estos biomarcadores tiene cierta controversia. Mientras algunos estudios sugieren que el FR y anti-CCP deberían ser utilizados en combinación para conseguir unas propiedades diagnósticas óptimas, otros estudios sólo encontraron un pequeño valor diagnóstico adicional combinando ambos biomarcadores.

En un reciente estudio realizado en Italia por Infantino y cols.³⁷⁷, han encontrado que la mejor combinación para el cribado de pacientes con sospecha de AR fueron los anti-CCP combinados con el FR IgM o IgA. Con las combinaciones “anti-CCP + FR IgM” y “anti-CCP + FR IgM + FR IgA” consiguieron una mejora en la sensibilidad pero con una menor especificidad. En nuestro caso, no ocurrió como en este estudio sino que la mejor combinación fue “anti-CCP o FR” con la que se obtuvo la mayor sensibilidad.

Se comparó la precisión diagnóstica de los distintos biomarcadores. El área bajo la curva para los anti-CCP y FR fue de 0,89 y 0,90 respectivamente, no encontrándose diferencia respecto a la precisión diagnóstica en una consulta de atención primaria. Este resultado que hemos obtenido es similar a otros estudios⁴⁴⁶ pero difiere de otros que señalan que los anti-CCP presentaron un mejor rendimiento diagnóstico que el FR^{477,478}. Estas diferencias encontradas pueden ser debidas a los distintos puntos de corte empleados, diferentes poblaciones de pacientes y tamaños poblacionales estudiados, como se ha reseñado. De hecho, para una consulta de atención primaria, el punto de corte recomendado por nuestro estudio es menor (22 U/mL) que en atención especializada. Con las combinaciones “anti-CCP+FR” y “anti-CCP+FR+ PCR” aumento ligeramente el área de las curvas a valores de 0,93 y 0,94 respectivamente.

Sin embargo, las diferencias en los niveles de anti-CCP y FR entre los pacientes con AR y los otros grupos fue altamente significativa ($p < 0,0001$) lo que enfatiza que ambos biomarcadores presentaron un rendimiento diagnóstico similar en atención primaria.

En un meta-análisis por Sun y cols.⁴⁷⁹ concluyeron que tanto el FR como los anti-CCP son pruebas útiles y complementarias en el diagnóstico de la AR y, como ocurre en nuestro estudio de una consulta de atención primaria, la combinación de ambos anticuerpos puede incrementar el valor diagnóstico proporcionando un importante valor clínico. Por tanto, con los resultados obtenidos la combinación “anti-CCP o FR” sería la mejor combinación en atención primaria a la hora de realizar un cribado de pacientes para derivarlos a una consulta especializada de artritis precoz.

Valor diagnóstico de biomarcadores en una consulta especializada de Artritis Precoz

Para estudiar el valor diagnóstico de los biomarcadores en una consulta especializada de artritis precoz, éstos se determinaron en una población que acuden a dicha consulta para evaluar su capacidad de diferenciar entre AR y otras formas de artropatías inflamatorias en la primera visita. En este escenario, se obtuvo una alta especificidad para los anti-CCP del 96% mientras que para el resto de biomarcadores fue inferior. Sin embargo, la mayor sensibilidad se obtuvo para la combinación “anti-CCP o FR” con un valor de 86% pero a su vez presentó una especificidad menor del 73%. La alta especificidad obtenida con los anti-CCP resultó en un alto VPP del 95% mientras que para el VPN se obtuvieron valores cercanos para ambos biomarcadores, siendo del 80% para el FR y del 74% para los anti-CCP.

El mayor VPP de los anti-CCP comparados con el FR es explicado por el hecho de que la especificidad es más importante que la sensibilidad a la hora de determinar el VPP de un test. Con la combinación de biomarcadores, no se obtuvo una mejora significativa en la especificidad en relación a los anti-CCP. Asimismo, el VPP fue similar a los anti-CCP mientras que el VPN disminuyó en relación al obtenido para el FR. Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad para los anti-CCP se encuentran de acuerdo con estudios previos realizados donde la sensibilidad se sitúa en torno al 64-74% y la especificidad entre el 90-99%^{346,348,385,480-482}. En un estudio similar realizado en el área mediterránea por Alexiou y cols. se obtuvieron resultados similares para los anti-CCP con una sensibilidad del 63% y una especificidad del 92%. Sin embargo, para el FR la sensibilidad fue menor en dicho estudio con un valor del 59% mientras que la especificidad fue algo superior y de 87%⁴⁸³.

En otro reciente estudio basado en una consulta especializada de artritis precoz se obtuvo una sensibilidad y especificidad para el FR de 67 y 79% respectivamente, mientras que para los anti CCP fue de 79% y 98%, respectivamente⁴⁸⁴. Las especificidades obtenidas son similares a las nuestras pero los valores de sensibilidad difieren entre ambos estudios. Con la presencia de uno u otro anticuerpo (anti-CCP o FR) la sensibilidad aumento al 85% como ocurre con nuestro estudio donde dicho aumento fue del 86%.

Las diferencias que se pueden encontrar entre distintos estudios pueden ser explicadas por las características de las cohortes estudiadas e incluso los distintos puntos de corte empleados en los ensayos de determinación de anticuerpos y la generación del ensayo empleado en el caso de los anti-CCP. Con el descubrimiento y posterior desarrollo de las distintas generaciones de anticuerpos anti-CCP, en la actualidad nos encontramos con el que podemos considerar como el marcador serológico específico más adecuado para el diagnóstico precoz de la AR. Los resultados obtenidos en nuestra población indican que los anti-CCP son en una herramienta fundamental para confirmar el diagnóstico de AR en los pacientes con artritis de inicio derivados a una consulta de atención especializada. En cambio, el FR, dada su inespecificidad, se puede encontrar presente en pacientes con otras enfermedades autoinmunes e infecciosas como se ha comentado, incluso en una considerable proporción de pacientes sanos, particularmente en sujetos ancianos²³⁶.

En relación a la precisión diagnóstica de los distintos biomarcadores obtuvimos que el área bajo la curva para los anti-CCP y FR fue de 0,88 y 0,87 respectivamente, no encontrándose diferencia respecto a la precisión diagnóstica en una consulta especializada. En este caso, el punto de corte recomendado para los anti-CCP por el estudio es de 38 U/mL, muy próximo al punto de corte que empleamos en el laboratorio. Con el empleo de las combinaciones “anti-CCP+FR” y “anti-CCP+FR+PCR” aumento ligeramente el área de las curvas a valores de 0,92 y 0,93 respectivamente, mientras que para la combinación “anti-CCP o FR” fue idéntica a la obtenida para el FR.

Es necesario señalar que encontramos un grupo reducido de pacientes (14%, Tabla 20) donde tanto los anti-CCP como el FR fueron negativos. Este hecho es observable en la mayoría de los estudios realizados donde un porcentaje de pacientes tienen negativos ambos anticuerpos. Por ello, sería de ayuda diagnóstica el desarrollo de ensayos múltiplex con varios anticuerpos que incluyan distintas especificidades de

antígenos citrulinados como de isotipos de FR (IgM, IgG e IgA) o el desarrollo de nuevos marcadores para estos pacientes. En esta línea encontramos un reciente trabajo realizado por Melguizo y cols. donde señalaron que la adición de nuevos marcadores de estrés oxidativo como hidroperóxidos lipídicos o proteínas carboniladas serían útiles en el diagnóstico de pacientes con anti-CCP negativos⁴⁸⁵.

También es necesario comentar que la cuantificación de las cadenas ligeras libres en suero, empleadas en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de pacientes con mieloma múltiple, se perfilan como un posible nuevo biomarcador en la AR. Se ha demostrado que el incremento policlonal de las cadenas ligeras libres precede al desarrollo de la AR y que el aumento de kappa libre y lambda libre están correlacionados con diversos parámetros de la enfermedad entre los que destacan el DAS28 y los niveles de anti-CCP, FR, PCR y VSG^{486,487}. De este modo, los niveles de cadenas ligeras libres podrían ser empleados como marcadores de la actividad de la enfermedad y en la evaluación de la progresión de la misma.

En este contexto, la AR queda definida no como una entidad única sino como una entidad que según la presencia de determinados anticuerpos presentaría una expresión clínica determinada y un pronóstico distinto. Por último señalar que la alta especificidad que presentan los anti-CCP es el aspecto más valioso de este ensayo lo que explicaría uno de los motivos de su inclusión en los criterios diagnósticos de la AR de la ACR/EULAR (2010)¹⁷. Además, la adición de los anti-CCP a estos criterios ha reforzado el rol del laboratorio clínico en el diagnóstico de la AR.

Efecto del epitopo compartido y del hábito tabáquico sobre los anticuerpos en los pacientes con Artritis Reumatoide

Los estudios genéticos realizados han demostrado que los alelos HLA están implicados en un amplio número de enfermedades inflamatorias crónicas. En el caso que nos ocupa, el principal gen asociado con la AR es el EC HLA-DRB1 que incluye a los alelos DRB1*01, DRB1*04 y DRB1*10⁵⁸. La mayoría de estos estudios en AR se han realizado en el continente europeo, sobre todo en los países de la zona norte, demostrando una consistencia en sus resultados. La evidencia científica de los últimos años señala que los alelos del EC HLA-DRB1 están asociados sólo con un subgrupo de pacientes con AR caracterizados por la presencia de anti-CCP y/o FR^{235,245,257,488}. Un estudio reciente de GWAS en pacientes con anti-CCP positivos apoya la idea de que distintos factores genéticos de riesgo intervienen en los distintos subgrupos de

pacientes definidos por el estado de los anti-CCP por lo que dichos subgrupos deberían ser estudiados y tratados como entidades separadas⁴⁸⁹.

En nuestro estudio, realizado en pacientes del área sur de España, se ha validado que la presencia del EC confiere un riesgo de desarrollar AR con anti-CCP positivos (OR=2,68, IC95% 1,11-6,46) de la misma manera que se observó en los estudios realizados en el norte de Europa. Cuando estratificamos el EC como heterocigoto y homocigoto se observó que el aumento de la dosis génica trajo consigo el consiguiente aumento del OR coincidiendo con estudios precedentes. El OR para el EC homocigoto fue de 3,48 (IC95% 0,92-13,25) mientras que para el EC heterocigoto fue de 2,50 (IC95% 1,00-6,24). Sin embargo, tanto para el FR como para la presencia simultánea de ambos anticuerpos no se encontró una asociación significativa. Estos datos obtenidos sugieren que el EC se asocia principalmente a la presencia de anti-CCP y no del FR en los pacientes estudiados en nuestra área geográfica.

Pero no solo eso, cuando estudiamos los niveles de anti-CCP según el EC, observamos que aunque los pacientes con EC positivo presentaban niveles superiores de anti-CCP, al estratificar el EC según la dosis génica, en los pacientes homocigotos los niveles de anti-CCP fueron superiores a los pacientes heterocigotos. Sin embargo, las diferencias entre estos dos grupos no llegaron a ser significativas. Sorprendentemente, para el FR si se observó una asociación entre los niveles de FR según el EC. Al igual que para los anti-CCP, las diferencias no llegaron a ser significativas entre los estados heterocigoto y homocigoto.

En un estudio similar realizado por Balsa y cols. en nuestra área geográfica encontraron una asociación dosis dependiente entre la presencia de los alelos del EC y los títulos de anti-CCP y FR. Sin embargo, estudiaron otros alelos como HLA-DR3 y los alelos que codifican la secuencia protectora DERA A pero sus resultados no apoyaron el efecto protector de dichos genes¹⁰⁴.

Esta falta de significación entre los niveles de anticuerpos y la dosis génica que hemos obtenido en nuestros resultados puede ser debido a tres razones. En primer lugar a que el EC HLA-DRB1 no es el único factor genético que influye en los anticuerpos sino que hay otros genes tanto protectores como de susceptibilidad que no hemos estudiado ya que no se determinan en la práctica clínica diaria. En segundo lugar, al bajo número de pacientes que constituyen el grupo homocigoto tras la estratificación lo que limita la interpretación de los resultados y por lo que sería

necesario un nuevo estudio incluyendo más pacientes para validar el efecto de la dosis génica en nuestro entorno. Y por último, que no hemos prescindido de valores extremos ya que consideramos que no son como tales sino que intervienen varios factores genéticos y ambientales en sus niveles.

Bien es conocido que el hábito tabáquico afecta tanto a la repuesta inmune celular como humoral ya que presenta tanto efectos pro-inflamatorios como inmunosupresores. De esta manera, su presencia se asocia a muchas enfermedades autoinmunes como LES, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, y como no, el caso que nos ocupa, la AR. El hábito tabáquico representa, sin lugar a dudas, el factor ambiental de riesgo más destacado y argumentado para el desarrollo de la AR. Desde la primera observación a finales de los años 80 de la asociación del tabaquismo con la AR en un conjunto de mujeres²⁰⁴, consecutivos estudios tanto de casos y controles como de cohortes han identificado el tabaquismo como un importante factor de riesgo en la AR. Varios estudios han reportado un mayor riesgo de padecer AR asociado a un consumo acumulado de tabaco^{41,146,214}.

Heliövara y cols.²⁰⁸ encontraron que la exposición al humo de tabaco puede desencadenar la producción del FR y contribuir al desarrollo de la AR mientras que Uhlig y cols.²⁰⁵ identificaron al hábito tabáquico como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de AR en hombres, especialmente en la AR seropositiva para el FR (OR 4,77 IC95% 2,09-10,90). Igualmente, en un estudio realizado en mujeres encontraron que la duración pero no la intensidad del hábito tabáquico estuvo asociado con un riesgo incrementado de AR, tanto seropositiva como seronegativa para el FR⁴¹. Sin embargo, en un estudio por Costenbader y cols.²¹⁴ encontraron que tanto la duración como la intensidad del hábito tabáquico estaban directamente relacionadas con el desarrollo de AR, en particular, con la AR seropositiva. En dicho estudio la asociación se dio tanto en fumadores activos como en ex fumadores.

Por ello, en nuestros pacientes también estudiamos el efecto del hábito tabáquico sobre la presencia de anticuerpos. De los resultados obtenidos se extrajo que el hábito de fumar, ya sea entendido como ex fumador o fumador activo, se asoció tanto con la presencia de anti-CCP (OR=2,79; IC95% 1,12-6,97) como con el FR (OR=3,89; IC95% 1,06-14,28) y ambos anticuerpos a la vez (OR=2,49; IC95% 1,05-5,91) al igual que refieren los trabajos anteriormente mencionados. Por el contrario, al estratificar los fumadores como ex fumadores y fumadores en activo, los resultados no llegaron a ser significativos. Apoyaría el hallazgo de Costenbader y cols.²¹⁴ donde

señalan que la asociación se da independientemente del estado actual de exposición al tabaco, afectando tanto a fumadores activos como ex fumadores.

En los pacientes fumadores, un parámetro que se emplea habitualmente es el índice de tabaquismo que mide la cantidad de tabaco consumido en paquetes/año y que tiene en cuenta los años que llevan fumando el paciente. Por ello, en los pacientes con AR estudiamos la relación entre el índice de tabaquismo y la presencia de los distintos anticuerpos. Se obtuvo que un índice de tabaquismo alto (>20 paquetes/año) estuvo asociado con la presencia de anti-CCP (OR=8,93; IC95% 1,95-40,82), FR (OR=8,33; IC95% 1,05-66,22) y ambos anticuerpos a la vez (OR=6,82; IC95% 1,87-24,85) (Tabla 30). Sin embargo, para un índice de tabaquismo bajo, con un consumo comprendido entre 1 y 20 paquetes/año, no se obtuvo una asociación significativa con la presencia de los anticuerpos. Parte de esa falta de significación podría ser explicada por el número bajo de pacientes contenidos en esa categoría. La evaluación de los niveles de anticuerpos en los pacientes con AR y según el índice de tabaquismo avalan los resultados mencionados sobre la presencia de anticuerpos. De este modo, obtuvimos resultados similares donde los pacientes con índice de tabaquismo alto presentaron niveles más altos de dichos anticuerpos, tanto para los anti-CCP como el FR.

Al estudiar los niveles de anticuerpos según el hábito tabáquico se observó que los fumadores presentaron niveles más altos tanto de anti-CCP como de FR que los no fumadores. Es interesante señalar que para los anti-CCP, se observó que los ex fumadores presentaron niveles más altos de dichos anticuerpos que los fumadores activos. Este hecho sería atribuible a que presentaban un mayor índice de tabaquismo en relación a los fumadores activos (Tabla 17).

Aunque la etiología de la AR no se conoce en su totalidad, los hallazgos de los últimos años sugieren que el hábito de fumar actuaría como un desencadenante ambiental para la AR induciendo una inmunidad contra residuos de citrulina en sujetos que poseen alelos del EC. Como describió Klareskog y cols.²⁵⁹, el EC y el hábito tabáquico no influyen por separado en los anticuerpos sino que, interaccionan entre ellos y dicha interacción confiere un riesgo de desarrollar AR pero restringida sólo a lo que se conoce como enfermedad seropositiva, es decir, al subgrupo de AR seropositiva para el FR y/o los anti-CCP pero no para la AR seronegativa a dichos autoanticuerpos.

Nuestros resultados apoyan estas hipótesis sólo para los pacientes con AR y anti-CCP positivos, confirmándose que los pacientes fumadores con el EC positivo tenían asociados una mayor reactividad hacia los anti-CCP positivos con un OR de 3,75 (IC95% 1,12-12,53) (Tabla 32). En el grupo de fumadores hubo un 86% de pacientes con anti-CCP positivos mientras que en el grupo de no fumadores este porcentaje descendió al 63%. Sin embargo, en los pacientes con EC negativo no se encontró una asociación significativa entre el hábito tabáquico y la presencia de anti-CCP positivos lo cual confirma los resultados de estudios previos^{174,235,257,262,490}.

En los pacientes con AR y sólo en aquellos que eran portadores de los alelos del EC, se observó también una asociación entre el EC y el IT sobre la presencia de anti-CCP. En los pacientes con EC positivo y un IT alto se observó un mayor porcentaje de pacientes con anti-CCP positivos (95%) que en el resto de grupos. Para los pacientes con EC negativo no se observó una asociación significativa al igual que ocurrió con el hábito tabáquico. En los pacientes con EC positivo se encontró que el IT alto (OR=12,00; IC95% 1,48-97,17), y por lo tanto la intensidad del consumo de tabaco, estuvo más fuertemente asociada que el hábito de fumar en sí (OR=3,75; IC95% 1,12-12,53) con un riesgo incrementado de anti-CCP positivos.

Aunque muchos de los estudios realizados solo evalúan la interacción entre el EC y el hábito tabáquico encontrándose una interacción significativa entre ambos factores, el número de estudios que tienen en cuenta tanto el hábito tabáquico como el IT es menor. En uno de ellos, Karlson y cols.⁴¹ encontraron una fuerte interacción genético-ambiental entre el EC y el tabaquismo cuando se estratificó según el IT más que al estratificar según el hábito tabáquico para el desarrollo de AR seropositiva. En el modelo de regresión obtenido por nosotros, encontramos que tanto el EC como el IT fueron las únicas variables independientes asociadas con la presencia de anti-CCP (Tabla 34), pero para el término de interacción entre ambos factores no se alcanzó el nivel de significación estadístico. Es interesante señalar que en el modelo multivariante el IT presentó un OR mayor que el EC. En dicho modelo obtuvimos un coeficiente de determinación R^2 del 30% lo que pone de manifiesto el carácter multifactorial de la AR y que los factores estudiados explicarían independientemente como máximo el 30% de la presencia de los anti-CCP. Por ello, aparte de los factores estudiados hay que considerar que intervienen más factores en la producción de anti-CCP.

Al referirnos a los niveles de anticuerpos en los pacientes con AR encontramos que tanto el hábito tabáquico como un índice de tabaquismo alto en presencia de los

alelos del EC influyeron conjuntamente en los niveles de anti-CCP y FR objetivándose una interacción entre los dos factores (Tablas 35 y 36). Del mismo modo que nosotros, van der Helm-van Mil y cols. obtuvieron resultados idénticos para los anti-CCP²⁶⁴. Tras realizar el correspondiente análisis multivariante identificamos que el EC, el IT y la interacción entre ambos factores fueron las únicas variables que independientemente influyeron en los niveles de anti-CCP. Para el FR la única variable independiente que influyó en sus niveles fue el EC.

Aparte del EC y el hábito tabáquico, considerados los principales factores que influyen en la AR, otros factores relacionados como la dieta mediterránea junto a otros factores asociados al entorno geográfico y cultural podrían tener un mayor impacto de lo esperado en la etiología de la enfermedad^{171,491,492,494,495}. Navarro Compán y cols. sugieren que la interacción entre el estrés oxidativo y el hábito tabáquico incrementa el riesgo de AR⁵¹⁵.

Un dato interesante es que uno de los factores ambientales que ha tomado relevancia en los últimos años y que parece presentar un papel interesante en la etiología de la AR es la periodontitis producida por la infección de la bacteria *P. gingivalis*²⁴³. Podemos considerar una limitación el hecho de que este dato no estaba recopilado en todos los pacientes con AR incluidos en nuestro estudio por lo que no fue posible evaluar dicha variable. Otra limitación que tenemos en nuestros resultados es que no hemos incluido en el estudio otros genes relacionados con la enfermedad y que no se determinan en nuestro hospital en la práctica clínica diaria.

Recientemente Wagner y cols. han desarrollado un ensayo multiplex que contienen 16 péptidos y proteínas citrulinadas detectadas en el tejido sinovial de pacientes con AR. Con este ensayo se pueden detectar en pacientes con anti-CCP negativos otras especificidades de anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados y se mejoraría la sensibilidad diagnóstica de los anti-CCP⁴⁹⁶. En respectivos trabajos realizados por Kokkonen y cols. y por Lundberg y cols. también estudiaron la respuesta de los anticuerpos a diversos péptidos citrulinados de alfa-enolasa, vimentina, fibrinógeno, filagrina y colágeno tipo II en AR^{497,498}.

Estos trabajos mencionados sugieren que el hábito tabáquico y la presencia de los alelos del EC y/o PTPN22 contribuyen al desarrollo de otras especificidades de anticuerpos contra péptidos citrulinados en AR aparte de los anti-CCP. Sin embargo,

son necesarios más estudios para entender la complejidad de los distintos subgrupos serológicos en la AR.

Valor pronóstico de los biomarcadores en los pacientes con Artritis Reumatoide

En la actualidad el pronóstico de la AR ha mejorado considerablemente debido a una mejor atención médica unido a la introducción precoz de los FARMES. Sin embargo, no cabe duda de que hoy en día encontramos un porcentaje de pacientes con una enfermedad agresiva y altamente incapacitante. Por todos es conocido el hecho de que el curso clínico de la AR varía de un paciente a otro encontrando aquellos en los que se consiguen un control completo de la enfermedad llegando incluso a alcanzar una remisión completa mientras que en otros se observa un curso agresivo e incapacitante de la enfermedad. En este contexto nos preguntamos si es posible predecir la evolución de la AR o si ciertos parámetros podrían ayudar a establecer el pronóstico de los pacientes.

Bajo estos supuestos, se hace necesario establecer factores pronósticos al momento del diagnóstico para seleccionar aquellos pacientes con un curso más desfavorable de la enfermedad. Para ello, estudiamos el posible valor pronóstico que puedan presentar los marcadores bioquímicos anti-CCP, FR y EC en una cohorte de pacientes recién diagnosticados de AR durante un periodo de seguimiento de 3 años. Como medidas de desenlace seleccionamos el daño estructural evaluado por la presencia de erosiones, discapacidad del paciente mediante el cuestionario HAQ y la actividad de la enfermedad evaluada por la puntuación DAS28.

En el año 2010, los nuevos criterios de clasificación de AR de la ACR/EULAR¹⁷ incluyeron a los anti-CCP como nuevo criterio a tener en cuenta. Pero no sólo ello, sino que tanto a los anti-CCP como el FR se les ponderaba con distinta puntuación ya se encuentren positivos por encima del valor de referencia o tres veces por encima de dicho valor. Así, en base a esta distinta valoración de los anticuerpos estratificamos a los pacientes en dos grupos según los dos puntos de corte definidos para los anti-CCP (40 y 120 U/mL) y el FR (20 y 60 UI/mL) y realizamos un estudio longitudinal. Estos estudios están caracterizados porque se realiza una medición basal de los parámetros que van a estratificar los pacientes, en nuestro caso los biomarcadores, y se siguen la evolución de las variables clínicas a estudiar durante un periodo determinado de tiempo.

Según los resultados que hemos obtenido para un **punto de corte de 120 U/mL para los anti-CCP**, los pacientes con anti-CCP positivos al diagnóstico no están exentos de presentar una menor respuesta al tratamiento con MTX valorado a través de la puntuación del DAS28. Éstos presentaron valores superiores del índice DAS28 pero mientras que en los pacientes con anti-CCP negativos se observó una tendencia a lo largo del tiempo a disminuir el DAS28; en los pacientes con anti-CCP positivos se observó la misma tendencia pero a los 36 meses se produjo una inversión con un aumento de nuevo del DAS28. En estos pacientes sería interesante valorar la inclusión precoz de terapia biológica para conseguir una mayor respuesta valorada según el DAS28. Si bien la utilidad pronóstica de los anti-CCP se ha descrito en otras series, en este estudio, los pacientes con niveles elevados de anti-CCP mostraron mayor actividad de la enfermedad, pero sin poder obtener conclusiones sólidas debido al reducido tamaño muestral.

Para el cuestionario HAQ los anti-CCP no aportaron valor pronóstico. Durante el primer año, el HAQ presentó una tendencia a disminuir en los dos grupos estabilizándose su valor a lo largo del tiempo. Por último, en la evaluación del daño estructural por la presencia de erosiones articulares, no se observaron diferencias significativas entre grupos. Aunque el grupo con anti-CCP positivo mostró un menor porcentaje de pacientes con erosiones articulares al diagnóstico, éstas fueron aumentando ligeramente hasta igualarse en ambos grupos a los 36 meses. En última instancia, para un **punto de corte de 40 U/mL para los anti-CCP** no se observó capacidad pronóstica significativa en relación a ninguna de las tres medidas de desenlace de la AR.

Varios estudios^{38,499,500} han evaluado los anti-CCP como factor pronóstico de daño articular y han concluido que el daño articular es mayor en pacientes con anti-CCP positivos. Visser y cols.³⁸¹ desarrollaron un modelo de predicción en pacientes con AR y encontraron que los anti-CCP estuvieron fuertemente asociados a artritis erosiva y esta asociación fue mayor que la encontrada con el FR. Vencovsky y cols.³⁰⁷ y Forslind y cols.³⁷⁸ también evaluaron el poder predictivo de los anti-CCP en pacientes con AR temprana. Estos anticuerpos predijeron la progresión del índice de Larsen dos años antes que el FR, sin observarse beneficios adicionales con el uso de ambos anticuerpos. En el estudio de Nell y cols. los anti-CCP presentaron un VPP de 88% para la evolución a enfermedad erosiva comparado con un VPP de 78% para el FR a títulos altos⁵⁰¹.

En un estudio realizado por Van der Helm-van Mil y cols., donde se compararon dos grupos de pacientes con anti-CCP positivos y negativos en una clínica de artritis precoz y durante un periodo de seguimiento de 4 años, no se encontraron diferencias significativas en la rigidez matutina, actividad de la enfermedad, PCR, NAI y NAD al diagnóstico. En el seguimiento de los pacientes, aquellos con los anti-CCP positivos presentaron más articulaciones inflamadas y una destrucción radiológica más severa concluyendo que el fenotipo de los pacientes con AR era similar respecto a la presentación clínica pero difiere respecto al curso de la enfermedad según la positividad para los anti-CCP⁵⁰². Al igual que en el estudio realizado por Van der Helm-van Mil y cols., nosotros no hemos encontrado diferencias en la presentación clínica del fenotipo de los pacientes con AR con respecto a los parámetros PCR, VSG, NAI, NAD, HAQ, DAS28 y erosiones articulares según los anti-CCP. Al igual que para los anti-CCP, en la presentación clínica no se encontraron diferencias para estos parámetros según el FR (punto de corte de 60 UI/mL) y el EC excepto para la variable HAQ>1.

Resultados similares fueron obtenidos por Kastbom y cols. en un estudio donde compararon las características clínicas de la enfermedad al diagnóstico para pacientes con AR. En dicho estudio no se observaron diferencias significativas en la visita basal para el NAI, PCR, DAS28 entre pacientes con y sin anticuerpos anti-CCP positivos. Durante el seguimiento de los pacientes en un periodo de tres años encontraron que los anti-CCP fueron un mejor predictor del curso de la enfermedad que el FR³⁸⁵. Recientemente, Mouterde y cols., de la misma manera que ocurrió en nuestro estudio, encontraron que el fenotipo de los pacientes con AR precoz con o sin anti-CCP y/o FR positivos no se corresponde a una presentación clínica particular⁵⁰³. Por otro lado señalan que la progresión radiográfica al año fue mayor sólo en los pacientes con anti-CCP positivos que en el resto de grupos de pacientes.

Sin embargo, según se detalla en diversos estudios, la utilidad de los anti-CCP como marcador es controvertida. Como marcador de la actividad y remisión de la enfermedad su utilidad es moderada y son precisos más estudios para profundizar en su validez en este aspecto. Como marcador pronóstico, desde el punto de vista de progresión radiológica, su utilidad también es moderada y, si bien en la mayoría de estudios se asocia con una peor progresión radiológica, algunos resultados contradictorios hacen aconsejables más estudios que confirmen con certeza los hallazgos^{38,307,344,345,502,504-506}.

En relación al FR y para un **punto de corte de 60 UI/mL** no se observaron diferencias significativas en el DAS28, HAQ y presencia de erosiones a lo largo del tiempo. Sin embargo, para la variable HAQ se observó que aunque las diferencias no fueron significativas estadísticamente entre grupos si podría presentar cierto valor clínico. La diferencia en valor absoluto de la variable HAQ en cada momento del seguimiento entre los dos grupos fue de 0,6 al diagnóstico, de 0,6 a los 12 meses, de 0,7 a los 24 meses y de 0,1 a los 36 meses. En los tres primeros puntos de seguimiento se puede considerar esa diferencia relevante desde un punto de vista clínico mientras que en el último punto llega a ser mínima la diferencia entre ambos grupos. De estos resultados se desprende que sería necesario aumentar el número de pacientes para determinar si el FR es capaz de discriminar entre los dos grupos o no. Considerando un **punto de corte de 20 UI/mL para el FR** no se observó capacidad pronóstica significativa en relación a las medidas de desenlace de la AR al igual que ocurrió con el EC cuando se empleó como parámetro pronóstico.

Numerosos estudios han coincidido en que el FR positivo es un importante predictor de daño articular durante los años de la enfermedad aunque a largo plazo también estuvo asociado a un peor pronóstico^{345,501,507}. Jansen y cols. concluyeron que la progresión radiográfica a un año estuvo precedida por el FR positivo³⁴⁴. En un estudio por Kuru y cols. encontraron mayores valores para los índices de Larsen, DAS28, HAQ, PCR y VSG en pacientes con valores de FR positivo⁵⁰⁸. Este hecho no ocurrió en nuestro caso, donde no se observaron diferencias significativas para las variables estudiadas al diagnóstico (DAS28, NAI, NAD, HAQ, PCR y VSG). En un estudio reciente y al contrario a nuestros resultados, Viatte y cols.⁵⁰⁹ señalan que en pacientes con AR, la presencia del EC positivo estuvo asociado con severidad radiológica, mortalidad y peor respuesta al tratamiento.

En nuestro estudio pronóstico de los biomarcadores en AR podemos considerar que tenemos dos limitaciones; una condicionada por el tipo de variable elegida para valorar el daño radiográfico y otra debido al número de pacientes estudiados. En la revisión bibliográfica y con respecto al daño articular, la mayoría de los estudios han estudiado el valor pronóstico de los anti-CCP y el resto de biomarcadores de forma cuantitativa en relación a los índices de daño articular y no de manera cualitativa en relación al porcentaje de pacientes con erosiones. En nuestro estudio hemos encontrado el inconveniente de que no se ha podido recopilar el valor del daño articular mediante el índice de Sharp-van der Heijde o el índice de Larsen donde se evalúan las erosiones y la disminución del espacio articular. Eso es debido a

que dichos índices no estaban disponibles para un alto porcentaje de los pacientes por lo que se decidió no hacer un estudio cuantitativo sino de carácter cualitativo. Con el uso de los índices se podría haber obtenido resultados más esclarecedores en relación al daño articular. Tampoco pudimos realizar un abordaje pronóstico basado en un modelo de regresión logística multivariante ya que debido al bajo número de pacientes en seguimiento durante 3 años sería necesario aumentar la cohorte de pacientes para que nos permitan introducir un número adecuado de variables pronósticas en el modelo y obtener un resultado satisfactorio. Si bien no hubo diferencias entre los 59 pacientes incluidos en el estudio pronóstico y los 47 pacientes perdidos de seguimiento, la naturaleza de los datos limita las conclusiones.

En resumen, según nuestros resultados, el estatus de los anti-CCP al momento del diagnóstico se podría considerar como el único biomarcador valorable en el curso de la enfermedad y, por lo tanto, aportaría valor pronóstico en los pacientes diagnosticados de AR. En nuestra cohorte de pacientes, el punto de corte establecido por el fabricante de 40 U/mL no presentó valor pronóstico sino que fue el punto de corte de 120 U/mL, asociado a una mayor puntuación en los criterios de clasificación de ACR/EULAR 2010, el que presentó cierto valor pronóstico en la valoración del DAS28 durante el tratamiento de los pacientes. Este resultado pone de manifiesto que los puntos de corte empleados para el pronóstico no tienen por qué coincidir con los puntos de corte empleados en el diagnóstico y/o establecidos por el fabricante.

Aunque se ha investigado mucho sobre el valor pronóstico de los biomarcadores, el anti-CCP permanece como el biomarcador preferido que puede aportar cierta información a la respuesta de los pacientes al tratamiento. Por ello, sería recomendable ampliar el estudio con más pacientes o diseñar otro estudio con una cohorte mayor para evaluar la utilidad de los biomarcadores, y principalmente los anti-CCP, en el pronóstico de la enfermedad evaluado según las variables de gravedad de la enfermedad.

Es necesario señalar la influencia que puede tener el tratamiento ya que muchos estudios realizados no analizan adecuadamente la estrategia terapéutica empleada. Por ejemplo, en un estudio sobre factores al inicio de la enfermedad en 142 pacientes con AR de inicio y en seguimiento durante 6 años se encontró que los pacientes con FR positivo al inicio no tenían una mayor progresión radiográfica pero, por el contrario, si la tenían el grupo de pacientes donde el FR era positivo al cabo de un año iniciada la terapia⁵¹⁰.

En ese sentido, nuestro estudio longitudinal está formado por pacientes que iniciaron tratamiento tras el diagnóstico y los estudiamos durante un periodo de tres años. Sin embargo, no fue posible analizar los cambios en la estrategia terapéutica empleada dado el tamaño muestral de pacientes en seguimiento. Durante el periodo de seguimiento, algunos pacientes empezaron terapia con biológicos. Sería deseable haber incluido los cambios en el tratamiento durante el seguimiento de los pacientes. Pero debido al tamaño de la muestra y los diversos tratamientos se hubiese generado varios grupos de pocos pacientes que nos dificultarían el análisis estadístico. Por ello se optó por prescindir de cambios en el tratamiento de los pacientes y una interpretación más general de los resultados evolutivos.

A pesar de las limitaciones señaladas y de acuerdo a los hallazgos bibliográficos podemos considerar que no existe una única variable o factor pronóstico que pueda predecir de una manera fiable la evolución hacia una enfermedad grave siendo necesaria la combinación de distintas variables para incrementar el poder predictivo. Así, se hace necesario identificar nuevas variables con valor pronóstico y combinarlas a las actuales con el fin de diseñar una estrategia terapéutica en base a estos factores pronósticos y evaluar su eficiencia a corto y largo plazo. En este contexto, los anticuerpos anti-MCV parecen presentar una mayor sensibilidad que los anti-CCP a la hora de definir un grupo de pacientes con AR precoz y actuar como un prometedor marcador diagnóstico y pronóstico en AR. Los pacientes con anti-CCP y anti-MCV positivos simultáneamente presentaron un peor desenlace de la enfermedad con una tasa más rápida de destrucción articular⁵¹¹.

Paralelamente a este estudio, Wagner y cols. encontraron que los anti-MCV eran un importante biomarcador diagnóstico en AR y que los niveles de dicho anticuerpo se correlacionaron bien con la actividad de la enfermedad⁵¹². En otro estudio, Boire y cols. encontraron que los anticuerpos anti-Sa presentaron un mejor valor pronóstico en la destrucción articular que los anti-CCP y el FR⁵⁰⁵.

Consideraciones finales

Hoy en día, la AR es una enfermedad que se gestiona considerablemente mejor que en el pasado debido tanto a los avances en el diagnóstico como en el tratamiento. Nuestro creciente conocimiento en la relación de los biomarcadores con la

AR ha sido y sigue siendo una parte importante de este progreso. Las mejoras en el conocimiento de la etiología de la enfermedad nos han permitido mejorar la habilidad de los clínicos a la hora de diagnosticar la enfermedad en un estadio precoz.

Los autoanticuerpos son marcadores esenciales en el estudio de las enfermedades autoinmunes sistémicas. En el caso de pacientes con sospecha de AR; el FR y los anti-CCP son herramientas muy útiles en el diagnóstico, y muestra de ello es su inclusión en los criterios diagnósticos de ACR/EULAR del año 2010¹⁷. De esta manera, se ha empezado a identificar subgrupos de pacientes clínicamente relevantes que se puedan beneficiar de una medicina personalizada^{468,513,514}.

En la actualidad tenemos una amplia variedad de anticuerpos dirigidos contra distintos péptidos o proteínas citrulinadas cuya combinación, y junto con los distintos isotipos IgM, IgG y IgA de FR, pueden aportar un adecuado valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con AR. No obstante, son necesarios más estudios para obtener resultados relevantes. La identificación de nuevos biomarcadores como las cadenas ligeras libres y los marcadores de estrés oxidativo junto con el desarrollo de nuevos ensayos de anticuerpos citrulinados⁴⁹³, dirigidos contra las diversas especificidades antigénicas de péptidos y proteínas citrulinados, nos va a permitir una mejor definición de la AR así como de los subtipos que presenta y, por tanto, establecer mejor el pronóstico de los pacientes y la aplicación de tratamientos individualizados.

El actual estudio presenta algunas limitaciones o debilidades como se ha detallado en la discusión. Sin embargo, los resultados obtenidos nos permiten obtener conclusiones que son importantes en la práctica clínica diaria para el estudio de los pacientes con AR. Las ventajas del estudio son que nos permiten conocer la utilidad diagnóstica de los biomarcadores de autoinmunidad, conocer la asociación entre tabaquismo-autoinmunidad y AR y por último, perfilar la presencia de títulos mayores a 120 U/mL de anti-CCP como una variable de mal pronóstico estructural.

Finalmente, otro de los beneficios del estudio fue la presentación de comunicaciones a congresos nacionales e internacionales y ponencias a jornadas científicas junto a la consolidación de la determinación de los anti-CCP en la práctica clínica diaria en atención primaria desde que se introdujeran en la cartera de servicio de la Unidad de Bioquímica Clínica en el año 2005, con el beneficio que conlleva en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Del mismo modo se encontró que la medición

del EC es una prueba que por su coste no aporta mayor utilidad diagnóstica y su uso se encuentra limitado a ciertos casos precisos como en familias con multicasos de AR o en pacientes con una rápida progresión radiográfica.



VI

Conclusiones

1.- La prevalencia de la AR en una consulta especializada de artritis precoz es del 50%.

2.- La prevalencia de otras enfermedades reumáticas en una consulta especializada de artritis precoz es del 50%. Dentro de ellas, predominan la AI (58%) y la AT (30%) siendo minoritarias el resto de entidades: PSA, EA, EITC, LES y AC.

3.- Las variables demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes con AR son similares a las descritas en otros estudios en población mediterránea y española. La presentación clínica de los pacientes con y sin biomarcadores positivos, referido a los anti-CCP, FR y EC, fue similar.

4.- Los anticuerpos anti-CCP y FR presentan una alta asociación con la AR aunque el FR también está presente en un reducido grupo de pacientes del grupo NOAR a títulos bajos.

5.- La cuantificación de los anti-CCP es fundamental en aquellos pacientes donde el FR es negativo o donde el diagnóstico diferencial con otras enfermedades reumáticas es complicado.

6.- El EC presenta una alta asociación la con AR. La presencia del genotipo DR4, asociado a un peor pronóstico, se asocia fuertemente con la AR en nuestra población.

7.- En una consulta de atención primaria, la combinación “anti-CCP o FR” presenta el mejor valor diagnóstico para realizar un cribado de pacientes con sospecha de AR y derivarlos a una consulta especializada de artritis precoz.

8.- En una consulta especializada de artritis precoz, los anti-CCP presentan una alta especificidad para la AR que a su vez resulta en un alto VPP y nos permite confirmar el diagnóstico de AR en dicha consulta.

9.- El EC y el tabaquismo son factores de riesgo para el desarrollo de anti-CCP y FR. En los pacientes con EC positivo la intensidad del consumo de tabaco estuvo más fuertemente asociada que el hábito de fumar con un riesgo incrementado de anti-CCP positivos observándose una interacción entre ambos factores.

10.- Cuando se diagnostica la AR, los anti-CCP poseen valor pronóstico. Independientemente del tratamiento empleado y con un punto de corte de 120 UI/mL, los pacientes con anti-CCP positivos poseen una AR más activa a los tres años de evolución de la enfermedad.



VII

Anexos

Anexo 1

Aprobación del proyecto de investigación



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

D. MIGUEL ÁNGEL RICO CORRAL, COMO PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL ÁREA HOSPITALARIA VIRGEN MACARENA DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que esta Comisión en sesión celebrada el 24 de mayo de 2011 ha evaluado y aprobado del estudio titulado " Eficacia de los marcadores bioquímicos para el diagnóstico y pronóstico de la artritis reumatoide en pacientes que acuden a una consulta de atención especializada." cuyo investigador principal es José Luis García de Veas Silva.

Y para que conste firmo el presente documento en Sevilla, a 24 de mayo de 2011

Fdo: Miguel Ángel Rico Corral

Anexo 2

Consentimiento informado

Consentimiento informado del paciente

SERVICIO DE REUMATOLOGÍA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA
AVDA. DR. FEDRIANI S/N
41071 SEVILLA

NOMBRE DEL PACIENTE: _____.

INTRODUCCIÓN

La UGC de Reumatología y la UGC de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena solicitan su participación para un proyecto consistente en determinar el valor diagnóstico y pronóstico de marcadores bioquímicos (factor reumatoide, anticuerpos anti-CCP y epitopo compartido) en pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE EN FASE TEMPRANA, que usted padece. Por ello, se le pide que otorgue su consentimiento informado para que se consulte su historia clínica para la investigación de estos parámetros implicados en la enfermedad. Este documento se le proporciona para darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en este proyecto, decidiendo si desea participar o no en el mismo, ya que la participación es absolutamente voluntaria.

Su decisión acerca de participar o no en el proyecto no afectará a la atención médica que le proporcionen sus médicos.

Antes de tomar una decisión, lea atentamente este documento. Haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar. También puede consultar antes de decidirse con el médico, enfermera, familiares o amigos.

NATURALEZA Y OBJETIVO DEL PROYECTO. PROCEDIMIENTO DEL PROCESO

El estudio que se va a desarrollar consisten en investigar si algunas sustancias que se producen durante el proceso inflamatorio de la Artritis Reumatoide pueden servir, cuando se determinan en una fase precoz de la enfermedad, para identificar individuos o poblaciones con mayor riesgo de desarrollar enfermedad grave, con mayor grado de daño radiológico o deterioro de la función física. Para ello, se consultaran los resultados clínicos y analíticos de las visitas habituales en las que el médico hará una valoración del estado de su enfermedad. El equipo investigador estará formado por miembros de la UGC de Reumatología dirigidos por el Dr. Federico Navarro y por miembros de la UGC de Bioquímica Clínica, bajo la dirección de las Doctoras Concepción González Rodríguez y Blanca Hernández Cruz.

RIESGOS

Su participación no supone ningún riesgo para usted.

COMPENSACIÓN

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información que se obtenga, así como la información clínica referente a usted utilizada en las investigaciones futuras, será considerada confidencial y tratada en consecuencia. Para garantizar el anonimato de su identidad (asegurar que la información de sus datos no se relaciona con su identidad), sus resultados en la base de datos se identificarán con un código numérico y no con su nombre. Sólo este código, y nunca su identidad, aparecerán en las bases de datos donde figure la información clínica referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por una persona autorizada del equipo investigador, adoptándose medidas estrictas para que tal información no esté disponible más que para esa persona autorizada, que en ningún caso podrá desvelar su identidad a terceros.

NUEVOS HALLAZGO Y RESULTADOS

Las implicaciones médicas de los resultados de este estudio, si es que las hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado el proyecto de investigación. Es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, nunca los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento después de firmarlo y sin tener que explicar los motivos. Su no participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL

Usted puede contactar con cualquier miembro de la UGC de Reumatología de Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y FIRMA

PROYECTO: "Eficacia diagnóstica y pronóstica de marcadores bioquímicos en pacientes que acuden a Consulta de Reumatología con sospecha de Artritis Reumatoide de inicio".

Yo, _____ (nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con _____.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE

FECHA

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al paciente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

FIRMA

NOMBRE

FECHA

Se entrega copia de este documento al paciente.

Anexo 3

Hoja de recogida de datos

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS, AR

Fecha _____

Edad _____.

Tratamiento Actual:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____

Evolución _____

_____.

RM _____ DN SI NO

CONSIDERANDO SU ARTRITIS REUMATOIDE, COMO SE ENCUENTRA HOY DE: LA INFLAMACIÓN

1.- Hoy se siente usted: (marque con una "X" la mejor opción)

MUY BIEN _____ MUY MAL
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

EL DOLOR

2.- En relación al dolor, marque con una "X" el punto que mejor describa su situación actual:

SIN DOLOR _____ DOLOR MAXIMO
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

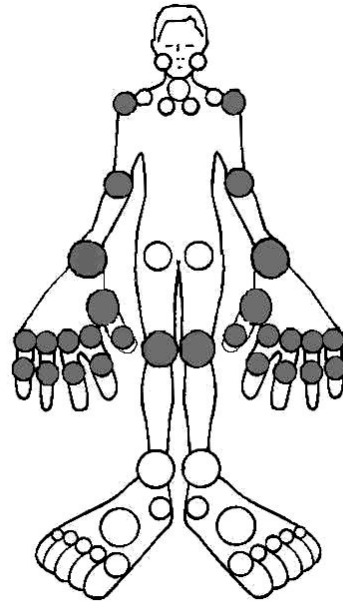
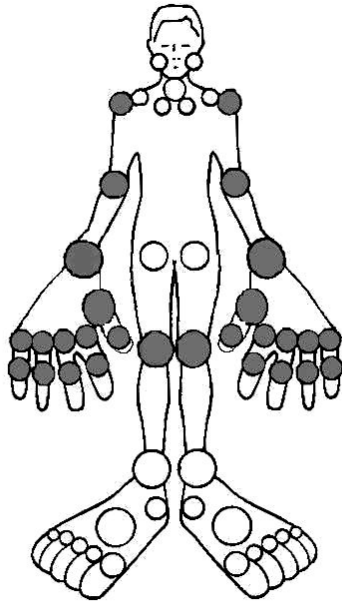
3.- EVALUACIÓN GLOBAL DEL MÉDICO:

MUY BIEN _____ MUY MAL
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

RECUENTO DE 28 ARTICULACIONES

DOLOROSAS _____

INFLAMADAS _____



VSG _____ . PCR _____ . DAS28() _____ . HAQ _____ .

Exploración física

Eventos adversos y analítica anormal

Cambios en el tratamiento

_____ . Próxima cita: _____ .

Anexo 4

Cuestionario HAQ

Cuestionario HAQ (Health Assessment Questionnaire)

En el cuestionario HAQ cada ítem puntúa de 0 a 3 según la siguiente escala:

- 0 = sin dificultad
- 1 = con alguna dificultad
- 2 = con mucha dificultad
- 3 = incapaz de hacerlo

El cuestionario cuenta con varias cuestiones correctoras que preguntan sobre la necesidad de utilizar algún tipo de utensilio o la ayuda de otra persona para realizar las actividades descritas en cada uno de los 20 ítems. Estas preguntas modifican la puntuación de las áreas a las que afectan. En el caso de los utensilios se pregunta sobre la necesidad de utilizar:

- Bastón o muletas, andador, silla de ruedas: afectan al área d) caminar – pasear
- Cubiertos de mango ancho: afecta al área c) comer
- Asiento o barra especial para el baño, asiento alto para el retrete: afectan al área e) higiene personal
- Abridor para tarros previamente abiertos: afecta al área g) prensión.

La necesidad de ayuda de otra persona puede afectar a todas las áreas. Para rellenar el cuestionario y evaluar la discapacidad física el paciente sigue las siguientes reglas:

- a) Primero, escoger la puntuación más alta de los 2 ó 3 ítems que componen cada una de las 8 áreas del cuestionario: a) vestirse, b) levantarse, c) comer,... h) otras actividades.

Por ejemplo, si en la categoría “c) comer” el enfermo ha contestado lo siguiente:

¿Es usted capaz de...

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1.- Cortar un filete de carne | [1] (con alguna dificultad) |
| 2.- Abrir un cartón de leche nuevo? | [2] (con mucha dificultad) |
| 3.- Servirse la bebida? | [0] (sin dificultad) |

Se puntuará como [2], o sea el valor más alto de los tres ítems que componen la categoría.

- b) Modificar la puntuación de cada área según las cuestiones correctoras, si fuera necesario. Si un área obtiene una puntuación de [2] ó [3] no es necesario mirar las cuestiones correctoras. Pero si obtiene una puntuación menor de [2], se debe tener en cuenta que la indicación por parte del enfermo de que precisa algún UTENSILIO o de la AYUDA DE OTRA PERSONA para cualquiera actividad relacionada con dicha área, obliga a asignar al área correspondiente una puntuación de [2].

Por ejemplo; si en el área “d) caminar” el enfermo ha contestado:

¿Es usted capaz...

- 1.- Caminar fuera de casa por un terreno llano? [0] (sin dificultad)
2.- Subir cinco escalones? [1] (con alguna dificultad)

Pero más abajo marca una cruz indicando que utiliza muletas, la puntuación del área “caminar” será [2] en vez de [1].

- c) Calcular la media. Hallar la media de los 8 valores correspondientes a las 8 áreas descritas: a) vestirse, b) levantarse, c) comer,... h) otras actividades; esa será la puntuación directa (PD) del cuestionario de capacidad funcional HAQ. La puntuación directa una vez transformada según el baremo del HAQ puede oscilar entre 0 (no incapacidad) y 3 (máxima incapacidad). En el caso de no contestar algún ítem se asigna el valor más alto de los restantes ítems que formen dicha área. Si hubiera una o dos áreas completas sin respuesta la suma de las 7 ó 6 áreas restantes se dividiría por 7 ó 6, respectivamente, para obtener el valor medio, que estará entre cero y tres (0-3). Un cuestionario con menos de 6 áreas contestadas, probablemente carece de validez.

Le rogamos lea atentamente cada pregunta y marque con una **X** la respuesta que mejor describa su estado durante la ÚLTIMA SEMANA.

<i>En esta última semana, ¿es Ud. capaz de..</i>	<i>Sin dificultad</i>	<i>Con algo de dificultad</i>	<i>Con mucho dificultad</i>	<i>Incapaz de hacerlo</i>
<i>(VESTIRSE Y ASEARSE)</i>				
..vestirse solo, incluyendo abrocharse los botones y atarse los cordones de los zapatos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...enjaponarse la cabeza?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>(LEVANTARSE)</i>				
...levantarse de una silla sin brazos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...acostarse y levantarse de la cama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>(COMER)</i>				
...cortar un filete de carne?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...abrir un cartón de leche nuevo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...servirse bebida?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>(CAMINAR-PASEAR)</i>				
...caminar fuera de casa por un terreno llano?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...subir cinco escalones?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Señale qué UTENSILIOS utiliza habitualmente para realizar estas actividades:

- bastón o muletas
- silla de ruedas
- andador
- cubiertos de mango ancho

Señale para qué actividades necesita la AYUDA DE OTRA PERSONA:

- vestirse, asearse
- levantarse
- comer
- caminar, pasear

Marque con una **X** la respuesta que mejor describa su estado durante la **ÚLTIMA SEMANA**.

<i>En esta última semana, ¿es Ud. capaz de...</i>	<i>Sin dificultad</i>	<i>Con algo de dificultad</i>	<i>Con mucho dificultad</i>	<i>Incapaz de hacerlo</i>
(HIGIENE PERSONAL)				
..lavarse y secarse todo el cuerpo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...sentarse y levantarse del retrete?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
... ducharse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(LEVANTARSE)				
...coger un paquete de azúcar de 1 kg de una estantería colocada por encima de su cabeza?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...agacharse y recoger ropa del suelo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(PRENSIÓN)				
...abrir la puerta de un coche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...abrir tarros cerrados que ya antes habían sido abiertos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...abrir y cerrar los grifos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(OTRAS ACTIVIDADES)				
...hacer los recados y las compras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...entrar y salir de un coche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
...hacer tareas de casa como barrer o lavar los platos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Señale qué **UTENSILIOS** utiliza habitualmente para realizar estas actividades:

- asientos o barra especial para el baño
- asientos altos para el retrete
- abridor para tarros previamente abiertos
- otros

Señale para qué actividades necesita la **AYUDA DE OTRA PERSONA**:

- higiene personal
- abrir y cerrar cosas

Total HAQ:

Anexo 5

Determinación del Epitopo Compartido

Determinación del Epitopo Compartido HLA-DRB1

1. Fundamento de la técnica

El kit “HLA-DRB1 Shared Epitope QKRAA/QRRAA/RRRAA” de la compañía GenID® GmbH permite una rápida y segura detección de los motivos QKRAA, QRRAA y RRRAA (Código de letras de los aminoácidos: Q glutamina, K lisina, R arginina, A alanina) en la tercera región hipervariable de la región de alelos HLA-DRB1.

La técnica para la determinación del epitopo compartido consiste en una hibridación reversa que es una variante de la hibridación en fase soluble (conjunto de técnicas en las que la primera hibridación ocurre en fase soluble en contraste a las técnicas de hibridación en fase sólida). El ADN extraído es sometido a una PCR con mezclas de cebadores preparados de modo que obtengamos la amplificación de la secuencia deseada.

En nuestro caso, el objetivo consiste en amplificar la gran mayoría de las variantes conocidas del gen HLA-DRB1 y otros genes comunes que nos servirán como control positivo de la PCR. Para ello, empleamos cuatro mezclas de cebadores ó Primers Nucleotides MIX (PN MIX) en cuatro reacciones de PCR independientes y que se denominan: PN MIX SE1, PN MIX SE2, PN MIX SE3 y PN MIX SE4. De este modo, potencialmente podríamos amplificar los genes de la tabla 44. Los genes humanos La/SSB y alfa-1 antitripsina serán amplificados en todo caso en el PN MIX correspondiente y servirán como control (Tabla 44).

PN MIX	Alelos DRB1 amplificados	Controles amplificados
PN-SE1	DR1	La/SS-B
PN-SE2	DR4	Alfa-1 antitripsina
PN-SE3	DR7, 10	La/SS-B
PN-SE4	DR3, 8, 9, 11-16	Alfa-1 antitripsina

Tabla 44. Especificidad de los PN MIX. Alelos HLA-DRB1 selectivamente amplificados con los mixes PN-SE1 a PN-SE4 y los controles correspondientes empleados para cada PN MIX.

Tras concluir el proceso de amplificación mediante PCR, el ADN es desnaturalizado y mezclado con sondas de detección acopladas a biotina. En este momento, el conjunto es puesto en contacto con tiras en las cuales existen inmovilizadas, sondas de captura con secuencias correspondientes a los oligonucleótidos que queremos detectar. Posteriormente, el ADN no hibridado es lavado. Por último, añadimos anticuerpos antibiotina conjugados con fosfatasa alcalina y unida a estreptavidina. Añadiendo el sustrato correspondiente (BCIP/NBT) se observa un cambio de color en la zona donde se produjo la hibridación. De este modo, obtenemos patrones característicos para cada subtipo de epitopo compartido.

2. Extracción del ADN

El ADN se va a extraer de una muestra de sangre del paciente con el kit de extracción Genomic DNA Purification Kit de Puregene®. Los pasos ordenador a seguir en la extracción del ADN se detallan en los siguientes puntos.

1. Extracción de la muestra

La sangre debe ser extraída en tubos con EDTA.

2. Lisis celular

Preparar una gradilla con 6 tubos de plástico para pipetear reactivos y 2xN eppendorf de 1,5 mL para las muestras (donde N=número de muestras). Rotular los eppendorfs por pares (1-1', 2-2', etc.) ya que se emplearan dos eppendorfs por muestra. En los 6 tubos de plástico preparar los reactivos necesarios para la extracción del ADN (Tabla 45).

Tubo	Denominación	Contenido
1	RBC SOL	N x 900 µL de RBC LYSIS SOLUTION
2	CEL SOL	N x 300 µL de CELL LYSIS SOLUTION
3	PRO SOL	N x 100 µL de PROTEIN PRECIPITATION SOLUTION
4	ISOP100	N x 300 µL de ISOPROPANOL al 100%
5	ET70	N x 300 µL de ETANOL al 70%
6	HYD SOL	N x 100 µL de ADN HYDRATION SOLUTION

Tabla 45. Preparación de los reactivos para la determinación del epitopo compartido. N hace referencia al número de muestras a analizar.

A continuación seguir los siguientes pasos para realizar la lisis celular:

- Añadir 900 μ L del tubo 1 (RBC SOL) a un eppendorf de 1,5 mL (rotulado como 1 para el caso de la muestra número 1).
- Añadir 300 μ L de sangre total de la muestra del paciente.
- Incubar la mezcla un minuto a temperatura ambiente.
- Invertir 10 veces el tubo con suavidad durante la incubación.
- Centrifugar 20 segundos a 12000 rpm. Tras la centrifugación se obtiene pellet en el fondo del tubo y un sobrenadante.
- Quitar el sobrenadante usando una pipeta y dejando en el tubo unos 20 μ L de líquido residual.
- Voltar 10 segundos para resuspender el pellet en el líquido residual.
- Añadir 300 μ L del tubo 2 (CEL SOL) y homogeneizar bien para producir el lisado de las células. Llegado a este punto, la técnica se puede detener y conservar los tubos 18 meses a temperatura ambiente.

3. Precipitación de proteínas

- Añadir 100 μ L del tubo 3 (PRO SOL) al lisado de las células.
- Voltar 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteínas de manera uniforme con el lisado celular.
- Centrifugar durante 1 minuto a 12000 rpm. Las proteínas precipitadas forman un pellet de color marrón. La zona superior será más clara, casi transparente o muy levemente marrón.
- En caso de que el pellet no sea compacto, volver a volter, incubar en gradilla refrigerada durante 5 minutos y centrifugar de nuevo.

4. Precipitación del ADN

- Añadir 300 μ L del tubo 4 (ISOP100) en eppendorf rotulado como 1´.
- Añadir el sobrenadante del eppendorf 1 al eppendorf 1´. El eppendorf 1 es desechado y a partir de ahora se trabajara con el rotulado como 1´.
- Mezclar la muestra invirtiéndola con suavidad 50 veces el eppendorf. El ADN se verá como una pequeña “nube blanquecina y tenue” flotando.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos. El ADN precipitará como un pellet blanquecino.

- Eliminar el sobrenadante con una pipeta y añadir 300 µL del tubo 5 (ET70).
- Invertir el tubo suavemente varias veces para lavar el pellet de ADN. El pellet de ADN debe ser visible aunque de forma tenue.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos y al finalizar invertir el eppendorf para eliminar el etanol.

5. Hidratación del ADN

- Añadir 100 microlitos del tubo 6 (HYD SOL).
- Incubar a 65°C durante 30 minutos para acelerar la rehidratación.
- Vortear 5 segundos a potencia media.
- Dar un spin de centrifuga de tal manera que la muestra quede en el fondo.
- El ADN extraído se puede guardar a 2-8°C.
- El rendimiento de la extracción es de unos 10000 ng de ADN. La concentración de ADN es aproximadamente de 100 ng/mL. Para medir el rendimiento obtenido se emplea un espectrofotómetro UV para medir la concentración de ADN obtenido tras el procesado de la muestra.

3. Amplificación de fragmentos HLA-DRB1 por SSP-PCR

La amplificación del ADN se realiza con el kit Amplification of “Fragments of the HLA-DRB1 Gene with Sequence-Specific Primers (SSP-PCR)” de GenID® GmbH. Para ello, los alelos HLA-DRB1 son amplificados en 4 reacciones específicas de PCR (SSP-PCR). Para la SSP-PCR se necesita un mínimo de 150 ng de ADN.

En la SSP-PCR, la amplificación tiene éxito cuando un alelo está presente para uno de los cebadores específicos marcados con biotina. Los PN MIXES contienen un control interno como control positivo para el éxito de la PCR y que pueden ser los genes La/SSB o alfa-1 antitripsina según el tipo de PN MIX (tabla 46). Como los controles positivos también son detectados por hibridación reversa, no es necesario analizar los productos de PCF mediante electroforesis en gel.

PN-SE2 amplifica todos los subtipos DRB1*04 y los raros subtipos DRB1*1122, DRB1*1410 y DRB9*0101. Estos últimos pueden ser distinguidos de los subtipos DRB1*04 en la hibridación reversa.

PN MIX	Variedad serológica	Alelos DRB1 amplificados	Controles amplificados
PN-SE1	DR1	DRB1*0101-0111	La/SS-B
PN-SE2	DR4	DRB1*04011-0450 DRB1*1122 DRB1*1410 DRB9*0101	Alfa-1 antitripsina
PN-SE3	DR7, 10	DRB1*0701-0708 DRB1*1001	La/SS-B
PN-SE4	DR3, 8, 9, 11-16	DRB1*03011-0328 DRB1*11011-1154 (excepto 1122 y 1130) DRB1*1201-1210 DRB1*1301-1365 DRB1*1401-1448 (excepto 1410, 1439 y 1446) DRB1*0801-0829 DRB1*09012-0903 DRB1*15011-1515 DRB1*16011-1608 DRB5*01011-0205	Alfa-1 antitripsina

Tabla 46. Especificidad de los PN MIX. Alelos HLA-DRB1 selectivamente amplificados con los mixes PN-SE1 a PN-SE4 y los controles correspondientes empleados para cada PN MIX. Todos los alelos conocidos del gen DRB1 son amplificados por los cuatro PN MIXES. Hay algunas excepciones en algunos subtipos muy raros como DRB1*1130, *1439 y *1446. Para interpretar la tabla y los resultados, los dos primeros dígitos suelen corresponder con la nomenclatura serológica (Por ejemplo, HLA-DRB1*04 corresponde con la variedad serológica HLA-DR4). Los dígitos tercero y cuarto corresponden con subvariedades algunas de las cuales presentan el epitopo compartido. A la hora de interpretar los resultados sólo nos interesan las subvariedades que presentan el epitopo compartido.

1. Preparación de las mezclas para la SSP-PCR

Las mezclas para la PCR se deben preparar en un lugar libre de ADN amplificado. Usar tubos de reacción de DNAsas y pipetas estériles. Se van a llevar a cabo 4 reacciones de amplificación con cada muestra de ADN. Para cada amplificación los siguientes reactivos son necesarios:

- Gradilla para eppendorf de 100 μ L y gradilla para eppendorf de 1,5 mL
- 4 eppendorf de 1,5 mL para pre-pipetear los PN MIXES 1, 2, 3 y 4
- 1 eppendorf para la MASTER MIX
- N eppendorf como muestras para analizar haya
- PN MIXES: PN-SE1, PN-SE2, PN-SE3 y PN-SE4 y TAQ polimerasa
- Buffer de la polimerasa (10X POLYMERASE BUFFER)
- Cloruro de magnesio 50 mM
- Agua bidestilada estéril
- Pipetas automáticas para manejar volúmenes de entre 0,5 y 200 μ L
- Puntas de pipetas, eppendorfs de 1,5 mL y 100 μ L estériles

El buffer de la polimerasa, la TAQ polimerasa y la solución de cloruro de magnesio se deben almacenar a -20°C y antes de trabajar con ellas se deben descongelar. Los PN MIXES se deben almacenar refrigerados a 4°C . Considerando **N** como el número de muestras; los pasos para preparar las mezclas para la PCR se exponen a continuación.

- En primer lugar hay que preparar los tubos para los PN MIXES y la MASTER MIX. Los tubos han de ser estériles. Sacar los reactivos del congelador y del frigorífico el tiempo imprescindible.
- A continuación rotular 4 eppendorf de 1,5 mL con los rotulos PNSE1, PNSE2, PNSE3 y PNSE4.
- Añadir en cada uno de estos eppendorf la siguiente cantidad de cada PN MIX:

$$\text{PNSE1} = N \times 35 \mu\text{L de PN SE1} + 2 \mu\text{L de PN SE1}$$

$$\text{PNSE2} = N \times 35 \mu\text{L de PN SE2} + 2 \mu\text{L de PN SE1}$$

$$\text{PNSE3} = N \times 35 \mu\text{L de PN SE3} + 2 \mu\text{L de PN SE1}$$

$$\text{PNSE4} = N \times 35 \mu\text{L de PN SE4} + 2 \mu\text{L de PN SE1}$$

- Para preparar la MASTER MIX en un eppendorf de 1,5 mL añadir **X** μ L de los siguientes reactivos, siendo $X = (N \times 4) + 2$:

$$X \times 5 \mu\text{L de (10X POLYMERASE BUFFER)}$$

$$X \times 2 \mu\text{L de Cloruro de Magnesio 50 mM}$$

$$X \times 4,5 \mu\text{L de agua bidestilada estéril}$$

$$X \times 0,5 \mu\text{L de TAQ polimerasa}$$

- En una gradilla pequeña para eppendorfs de PCR (100 μ L), colocamos 4 eppendorfs estériles numerados del 1 al 4 para cada una de las muestras y un eppendorf para el blanco (B). Para dos muestras sería:

11	12	13	14	Muestra 1
21	22	23	24	Muestra 2
B				Blanco

- Añadir 12 μ L de la MASTER MIX a cada uno de los eppendorf de 100 μ L.
- Añadir 35 μ L de primers PNSE1, PNSE2, PNSE3 y PNSE4 según corresponda a cada tubo y en el tubo del blanco (B) añadir PNSE1,2,3,4 variando cada vez que hagamos la técnica, para gastar cada vez una de las mezclas de primers.
- Añadir en cada tubo 3 μ L de muestra excepto en el tubo del blanco (B) donde se añaden 3 μ L de agua bidestilada estéril.
- Con este último paso, las muestras están listas para la PCR.

2. Protocolo para la SSP-PCR

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	5 minutos	95°C
20 ciclos	20 segundos 2 minutos	95°C 63°C
20 ciclos	10 segundos 30 segundos 30 segundos	95°C 60°C 72°C
1 ciclo	8 minutos	72°C
Final	-	4°C

Tabla 47. Protocolo para la SSP-PCR

3. Hibridación SSOP

Con la hibridación SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probes) procedemos al último paso de la técnica "HLA-DRB1 Shared Epitope QKRAA/QRRAA/RRRAA" de GenID® GmbH.

Los reactivos se deben guardar a 4°C. Además de los reactivos, necesitamos pipetas de 200-1000 µL, una pipeta de 10-40 µL y un baño con temperatura controlada (+/- 1°C) y agitador. Se emplea un termómetro de suficiente precisión para vigilar la temperatura. Para realizar la hibridación SSOP se siguen los siguientes pasos.

- Situar el termostato del baño a 47°C e introducir un termómetro de suficiente precisión para vigilar estrechamente la temperatura.
- Cuando la temperatura sea la óptima hay que introducir en el baño las soluciones números 2 y 3 del kit “HLA-DRB1 Shared Epitope QKRAA/QRRAA/RRRAA” para precalentarlas.
- En una gradilla se prepara una solución 1/100 del conjugado. Si **N** es el número de tiras que vamos a hibridar (N = número de muestras), hay que preparar N x 10 µL de *concentrated conjugate* en N x 1000 µL de *conjugate buffer*.
- Identificar cada pozo de reacción que vamos a utilizar relacionándolo con la muestra a analizar.
- Añadir 40 µL de *agente desnaturalizante* (solución 1) formando una gota.
- Para la primera hibridación, añadir 20 µL de mezcla de PNSE1/PNSE2 (PNSE3/PNSE4 en la segunda hibridación si fuera necesario) en el pozo de reacción sobre la gota de agente desnaturalizante.
- Añadir con cuidado 1 mL de buffer de hibridación (solución 2).
- Tomar la tira del tubo con pinzas identificando el número de la tira y relacionándolo con el número de la muestra y el pocillo. Colocar la tira en el pocillo de reacción y debe ser cubierta completamente con el fluido.
- Incubar 30 minutos la muestra a 47°C en el baño con agitación.
- Tirar el tampón de hibridación completamente y lavar las tiras dos veces por un minuto cada vez a temperatura ambiente y con solución de lavado (solución 3) precalentada.
- Para secar, poner la placa de los pocillos con las muestras sobre un papel absorbente.
- Añadir 1 mL de solución 3 precalentada en el pozo de reacción e incubarla 15 minutos en el baño a 47°C en agitación.
- A partir de aquí continuar a temperatura ambiente. Quitar la solución 3 utilizando el papel absorbente. Lavar dos veces por un minuto cada vez con la solución 4 en un agitador horizontal.

- Añadir 1 mL de conjugado diluido (1/100) con la solución 5. Incubar 30 minutos en el agitador horizontal a temperatura ambiente.
- Quitar el conjugado y lavar tres veces con la solución 6, un minuto cada vez un agitador horizontal. Tirar la solución 6 y secar con papel absorbente.
- Añadir 1 mL de sustrato (solución 7) e incubar 10-20 minutos a temperatura ambiente hasta observar las franjas de color de los controles y el test.
- Lavar dos veces con agua destilada para parar la reacción y tomar las tiras de los pozos de reacción con pinzas y secarlas con papel absorbente.

4. Interpretación de los resultados

Para analizar el epitopo compartido, diferentes alelos del HLA-DRB1 son amplificados en 4 PCR específicas para 4 grupos HLA-DRB1 (SSP-PCR). En las tiras hay definidas 14 zonas de reacción que corresponden a zonas de control y sondas de genes (Figura 62).

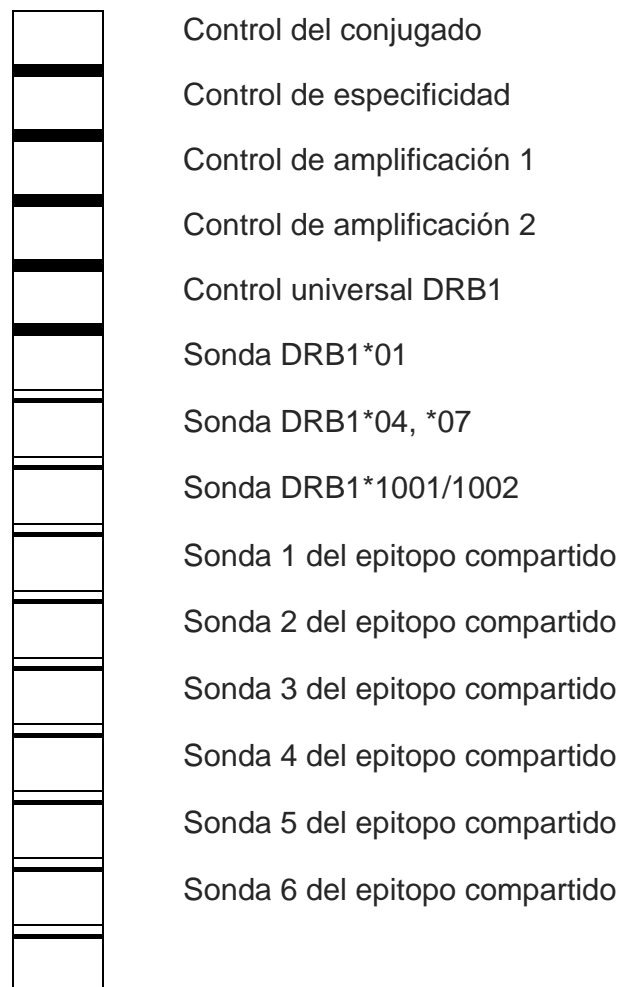


Figura 62. Tira de reacción utilizada en la hibridación reversa.

1. Interpretación de los resultados de la primera hibridación de los productos de la PCR mezcla de PN-SE1 y PN-SE2

En la primera hibridación sólo pueden ser detectados los alelos HLA-DRB1*01 y HLA-DRB1*04. Las combinaciones que se obtiene son las siguientes:

Columna 1) Alelo 1: DRB1*04-QKRAA

Si la sonda DRB1*04 y también las sondas 1 y 5 hibridan, un alelo DRB1*04 con el epitopo compartido QKRAA, al menos, está presente. En este caso, se debe realizar una segunda hibridación con los amplicones PN-SE3 y PN-SE4 para evaluar si el otro alelo es también DRB1*04-QKRAA, si el segundo alelo presenta otra variedad de epitopo compartido o si el segundo alelo no presenta el epitopo compartido.

Columna 2) Alelo 1: DRB1*04-QRRAA

Si la sonda DRB1*04 y también las sondas 2 y 5 hibridan, un alelo DRB1*04 con el epitopo compartido QRRAA, al menos, está presente. En este caso, se debe realizar una segunda hibridación con los amplicones PN-SE3 y PN-SE4.

Columna 3) Alelo 1: DRB1*04-QKRAA

Alelo 2: DRB1*04-QRRAA

Si la sonda DRB1*04 y las sondas 1, 2 y 5 se hibridan o revelan, están presentes ambos alelos del epitopo compartido.

Columnas 4) y 5) Alelo 1: DRB1*01-QRRAA

Si la sonda DRB1*01 y las sondas del epitopo compartido 2 y 5 (y raras veces sólo la sonda 2) se revelan; al menos, un alelo DRB1*01 con el epitopo compartido QRRAA está presente. En este caso, se debe realizar una segunda hibridación con los amplicones PN-SE3 y PN-SE4.

Columna 6) Alelo 1: DRB1*01-QKRAA

Si la sonda DRB1*01 y también las sondas 1 y 5 hibridan, un alelo DRB1*01 con el epitopo compartido QKRAA, al menos, está presente. En este caso, se debe realizar una segunda hibridación con los amplicones PN-SE3 y PN-SE4.

Columna 7) Alelo 1: DRB1*01-QKRAA

Alelo 2: DRB1*01-QRRAA

Si la sonda DRB1*01 y las sondas 1, 2 y 5 se hibridan o revelan, están presentes ambos alelos del epitopo compartido.

Columna 8) Alelo 1: DRB1*01-QRRAA

Alelo 2: DRB1*04-QKRAA

Si las sondas DRB1*01 DRB1*04 y las sondas 1, 2 y 5 se hibridan o revelan, están presentes ambos alelos del epitopo compartido.

Columna 9) Alelo 1: DRB1*01-QRRAA

Alelo 2: DRB1*04-QRRAA

Si las sondas DRB1*01 DRB1*04 y las sondas 2 y 5 se hibridan o revelan, están presentes ambos alelos del epitopo compartido.

Si la muestra no contiene ninguno de los alelos del grupo DRB1*01 y DRB1*04 y sólo el conjugado y los controles de amplificación se tiñen, se debe realizar una segunda hibridación con los amplicones PN-SE3 y PN-SE4 para comprobar si existe algunas de los siguientes alelos no-DR1/no-DR4 del epitopo compartido:

DRB1*1001/1002-RRRAA

DRB1*14-QKRAA

DRB1*11-/*13-/*14-QRRAA

2. Interpretación de los resultados de la segunda hibridación de los productos de la PCR mezcla de PN-SE3 y PN-SE4

En la segunda hibridación se detectan todos los alelos conocidos HLA-DRB1 excepto los que pertenecen a los grupos DRB1*01 y DRB1*04. Si el control universal DRB1 se detecta, un alelo no-DR1 o no-DR4 está presente.

Si el control universal DRB1 no se detecta, ningún alelo DRB1 está presente en esta segunda hibridación. Esto significa que el alelo detectado en la primera hibridación debe ser homocigoto.

Columna 1) Alelo 2: el segundo alelo es QKRAA

Un alelo DRB1 adicional con el epitopo compartido QKRAA está presente, si las sondas 1 y 5 junto con el control universal se hibridan.

Columna 2) Alelo 2: el segundo alelo es QRRAA

Un alelo DRB1 adicional con el epitopo compartido QRRAA está presente, si las sondas 2 y 5 junto con el control universal se hibridan.

Columna 3) Alelo 2: el segundo alelo es DRB1*1001 o DRB1*1002

Un alelo DRB1*1001/1002 adicional con la secuencia RRRAA está presente si junto con el control universal, se hibridan las sonda DRB1*1001/02 y la sonda 5 del epitopo compartido.

Columna 4) Alelo 2: no porta el epitopo compartido

Un alelo DRB1 sin el epitopo compartido está presente, si junto al control universal se obtiene un patrón de hibridación a los distintos anteriormente en las columnas 1 a 3.

Columna 5) El alelo 1 de la primera hibridación es homocigoto

Si el control universal DRB1 no se desarrolla, ningún alelo DRB1 está presente. Esto significa que el alelo detectado en la primera hibridación es homocigoto.

Anexo 6

Determinación de ANAs por IFI

Determinación de Anticuerpos Antinucleares por IFI

La determinación de los ANAs por el ensayo NOVA Lite® Hep-2 se basa en una técnica de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de ANAs de tipo IgG en suero humano. La IFI es el método de referencia que se emplea para la determinación de ANAs. La localización y el patrón de fluorescencia asociado a cada uno de los antígenos detectables por IFI se detallan en la tabla 48.

LOCALIZACIÓN	PATRÓN DE FLUORESCENCIA	ANTÍGENO
NUCLEAR	Homogéneo/ Periférico	ds-DNA, Histonas, Nucleosomas
	Moteado	RNP, Sm, SSA/Ro y SSB/La
	Granular difuso	Topoisomerasa I, Scl70
	Nucleolar	RNA-polimerasa I, NOR 90, Nucleolina o PM/Scl, Fibrilarina o U3nRNP
	Pleomórfico	PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) o Ciclina I
	Moteado fino	Centromérico (CENP A, B y C) y Nuclear Dots (Coilina-p80, Sp100)
	En anillo	Membrana nuclear (Laminina, Gp210)
CITOPLASMA	Moteado granular fino	t-RNA sintetasa (Jo-1)
	Mitocondrial	Complejo PDH
	Ribosomal	RNP Ribosomal
	Citoesquelético o Filamentoso	Actina, Vimentina, Citoqueratina, Tropomiosina
	Aparato Golgi	Aparato Golgi
	Lisosómico	Lisosómico
MITÓTICA	Fibras del Huso	Tubulina
	Polos del Huso	Aparato mitótico nuclear (NuMA)
	Centromérico	CENP-A, B y C
	Centríolos	Enolasa 48
	Cuerpo medio	Cuerpo medio (MSA-2)

Tabla 48. Localización y patrón de fluorescencia asociados a cada uno de los antígenos.

1. Fundamento de la técnica

El propósito de este procedimiento es definir las pautas a seguir para la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta con el ensayo NOVA Lite® HEp-2 ANA hasta su terminación para proceder a la visualización de patrones en microscopio de fluorescencia así como la interpretación de los patrones obtenidos y establecer posteriormente el estudio de otros parámetros que completan el estudio de la patología que queremos confirmar o descartar.

La técnica IFI se basa en la incubación del suero del paciente diluido con un sustrato tisular o celular para favorecer la unión antígeno-anticuerpo. En un segundo paso, si esta unión se ha producido al existir anticuerpos en el suero del paciente, al poner en contacto este complejo antígeno-anticuerpo con una proteína antihumana marcada con fluoresceína (conjugado), se produce la unión de ellos. Finalmente, se procede a visualizar las muestras en el microscopio de fluorescencia de modo que aquellas que son positivas exhibirán un color verde manzana fluorescente que corresponde a las áreas de la célula donde los anticuerpos del paciente se han unido.

2. Material necesario

- ✓ Tubos 5 ml
- ✓ puntas de pipeta desechables
- ✓ Gradillas
- ✓ Guantes desechables
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Filtro de papel
- ✓ Cubetas de lavado

3. Reactivos

- ✓ Portaobjetos con sustrato HEp-2 (células epiteliales humanas): 6 ó 12 portaobjetos/pocillos.
- ✓ Conjugado de anticuerpos anti-IgG humana (Cabra) marcados con fluoresceína en tampón con Azul de Evans y un 0.09% de azida sódica, 15mL.

- ✓ Control de Patrón ANAs Titulable, 1 vial de tampón con un 0.09% de azida sódica y anticuerpos de suero humano anti-HEp-2, prediluido, 0.5mL.
- ✓ Control Negativo para Sistemas IFA, 1 vial de tampón con un 0.09% de azida sódica y sin anticuerpos de suero humano anti-HEp-2, prediluido, 0.5mL.
- ✓ Concentrado de PBS II (40x), suficiente para 2000 mL.
- ✓ Medio de Montaje, 0.09% de azida sódica, 7mL.
- ✓ Cubreobjetos

Los reactivos se almacenan a 4°C.

4. Equipo necesario

- ✓ Centrífuga
- ✓ Pipetas automáticas (10-100-200-1000 µl)
- ✓ Temporizador
- ✓ Cámara húmeda
- ✓ Microscopio de fluorescencia

5. Antes de empezar

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente (20-26°C) y agitar

2. Diluya el concentrado de PBS II

IMPORTANTE: Diluya el concentrado de PBS II a 1:40 añadiendo el contenido de la botella de concentrado de PBS II a 975mL de agua destilada o desionizada y mezcle completamente. El tampón de PBS II se utiliza para diluir las muestras de pacientes y como tampón de lavado. El tampón diluido puede almacenarse un máximo de 4 semanas a una temperatura de 2-8 C.

3. Diluya las Muestras de los Pacientes

a. Screening Inicial: Diluya las muestras de los pacientes a 1:80 con un tampón de PBS II diluido (esto es, añada 50 L de suero a 1.95mL del tampón de PBS II).

b. Titulación: La inmunofluorescencia indirecta se realiza a titulación inicial 1/80. Realice series de diluciones dobles a partir de la dilución inicial de screening para todas las muestras positivas con el tampón de PBS II diluido (p. ej. 1:160,... 1:2560).

6. Procedimiento del ensayo

1. Preparación de los portaobjetos con substrato: Espere a que el portaobjetos con substrato alcance la temperatura ambiente antes de extraerlo de su funda. Etiquételo y colóquelo en una cámara húmeda adecuada. Añada 1 gota (20-25 L) de control positivo y negativo sin diluir en los pocillos 1 y 2 respectivamente. Añada 1 gota (20-25 L) de la muestra del paciente diluida a los pocillos restantes.

2. Incubación del portaobjetos: Incube el portaobjetos durante 30 + 5 minutos en una cámara húmeda (una servilleta de papel humedecida colocada plana en el fondo de un recipiente cerrado de plástico o cristal le permitirá mantener las condiciones de humedad adecuadas). No permita que el substrato se seque durante el procedimiento de ensayo.⁴

3. Lavado de los portaobjetos: Tras la incubación, utilice un frasco de lavado o una pipeta para lavar suavemente el suero con el tampón de PBS II diluido. Oriente el portaobjetos y el chorro del tampón PBS II de forma que le permita evitar, en la medida de lo posible, que la solución pase por encima de varios pocillos a la vez. Evite dirigir el chorro directamente sobre los pocillos para que no se dañe el substrato. Si está deseado, ponga los portaobjetos en un tarro de Coplin del almacenador intermediario diluido de PBS II por hasta 5 minutos.

4. Adición de conjugado fluorescente: Expulse el exceso de tampón PBS II. Sitúe el portaobjetos de nuevo en la cámara húmeda y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado fluorescente. Incube los portaobjetos durante otros 30 + 5 minutos.

5. Lavado de los portaobjetos: Repita el paso 3.

6. Cubreobjetos: Los procedimientos para los cubreobjetos varían de un laboratorio a otro; sin embargo, recomendamos el siguiente procedimiento:

a. Sitúe un cubreobjetos en una toallita de papel.

- b. Aplique el medio de montaje siguiendo una línea continua en el borde inferior del cubreobjetos.
- c. Elimine el exceso de tampón PBS II y ponga en contacto del borde inferior del portaobjetos con el borde del cubreobjetos. Deje caer suavemente el portaobjetos sobre el cubreobjetos de forma que el medio de montaje fluya hacia el borde superior del portaobjetos sin que se formen burbujas de aire ni se queden atrapadas.

7. Procedimiento de lectura

La lectura de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se realiza en el microscopio de fluorescencia siendo una lectura semicuantitativa mediante titulación. El microscopio de fluorescencia consta de una fuente de luz de longitud de onda múltiple que se mueve a través de un filtro excitador que solo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por un filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.

Lectura de resultados

Reacción Negativa. Se considerará una muestra como negativa si la tinción específica es igual o inferior al Control Negativo. Las muestras pueden mostrar diversos grados de tinción de fondo debido a los anticuerpos heterófilos o a niveles inferiores de autoanticuerpos contra algunos constituyentes del citoplasma, como las proteínas contráctiles.

Reacción Positiva. Se considerará una muestra como positiva si la tinción específica es superior al Control Negativo. Determinar el patrón de tinción de cada muestra y ponderar su intensidad.

8. Interpretación de resultados

1. Se considera lectura final en una titulación el último título positivo anterior a un título negativo. Se considera la dilución 1/160 como indicador de patología autoinmune y en

ese caso completamos el estudio con parámetros asociados a la patología que queremos confirmar o descartar.

2. Interpretación de patrones: Pueden presentarse diversos patrones de tinción nuclear y/u citoplasmática dependiendo de los tipos y de las cantidades relativas de autoanticuerpos presentes en la muestra. Los principales patrones de tinción que pueden presentarse se describen:

- a) **Homogéneo**: Tinción sólida del núcleo con o sin enmascaramiento aparente de los nucleolos. **Antígenos Nucleares presentes**: ADN de doble cadena, ADN de cadena simple, histona. **Enfermedad asociada**: Las valoraciones elevadas sugieren la presencia de LES; las valoraciones inferiores sugieren la presencia de LES u otras enfermedades del tejido conectivo.

- b) **Periférico**: Tinción sólida, primordialmente alrededor de la región más exterior del núcleo y tinción más débil hacia la parte central del núcleo. **Antígenos Nucleares presentes**: ADN de doble cadena, ADN de cadena simple, histonas. **Enfermedad asociada**: Las valoraciones elevadas sugieren la presencia de LES; las valoraciones inferiores sugieren la presencia de LES u otras enfermedades del tejido conectivo.

- c) **Moteado**: Tinción fina o de apariencia granulosa del núcleo, generalmente sin tinción fluorescente de los nucleolos. **Antígenos Nucleares presentes**: Sm, RNP, Scl-70, SS-A, SS-B, y otros sistemas antígeno/anticuerpo todavía sin caracterizar. **Enfermedad asociada**: Las valoraciones elevadas sugieren la presencia de LES (anticuerpo antiSm), enfermedades combinadas del tejido conectivo (anticuerpo anti-RNP), escleroderma (anticuerpo anti-Scl-70), o el complejo síndrome de Sjogren-sicca (anticuerpo anti-SS-B); las valoraciones inferiores sugieren otras enfermedades del tejido conectivo.

- d) **Nucleolar**: Tinción con motas grandes y gruesas en el núcleo, generalmente un número inferior a 6 por célula, con o sin motas finas ocasionales. **Antígenos Nucleares presentes**: 4-6S ARN y otros antígenos nucleares desconocidos. **Enfermedad asociada**: Las valoraciones elevadas son frecuentes en escleroderma y síndrome de Sjogren.

- e) **Centromérico**: Patrón de tinción con motas discretas. Las motas del núcleo son muy discretas y normalmente son múltiplos de 46. **Antígenos Nucleares**

presentes: Centrómeros cromosómicos (cinetocoro). **Enfermedad asociada:** Altamente indicativa del síndrome de CREST, una variante de la esclerosis sistémica progresiva. CREST es un tipo de PSS con calcinosis prominente, además del fenómeno Raynaud, dismotilidad esofágica y lesiones limitadas de la piel (frecuentemente confinadas a la cara o los dedos), telangiectasia.

- f) **Mitocondrial:** Moteado discreto del citoplasma y relativamente moderado en el área del núcleo. **Antígenos presentes:** Varios tipos de antígenos mitocondriales. **Enfermedad asociada:** Las valoraciones elevadas indican cirrosis biliar primaria.
- g) **Aparato mitótico (tipo NuMA):** Tinción de los polos del huso mitótico (“patrón triangular o en forma de plátano”). Las fibras del huso son negativas o débilmente positivas, con un patrón más lineal en células en telofase. Un patrón nuclear moteado fino con nucleolos negativos se ve en células en reposo y telofase pero también pueden ser negativas.

3. Se informarán título y patrón de inmunofluorescencia.

Un resultado positivo de ANAs con sospecha de enfermedad autoinmune sistémica se seguirá de la determinación del cribado de ENAs y de la medida de anticuerpos anti-dsDNA (Figura 63). Cuando la prueba de cribado sea positiva se realizará la determinación independiente de cada uno de los anticuerpos incluidos en el cribado de ENAs (anticuerpos anti- Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl70 y anti-Jo1).

En función de los patrones de inmunofluorescencia y de la sospecha diagnóstica el laboratorio puede iniciar pruebas de inmunotransferencia para su estudio. Para estudiar los antígenos responsables de los patrones de inmunofluorescencia obtenidos, determinar antígenos infrecuentes, confirmar resultados conflictivos de los inmunoanálisis automatizados o estudiar pacientes que precisen un estudio más complejo **se emplean perfiles que permiten determinar dichos antígenos de forma simultánea e individualizada.** Estos perfiles mediante inmunotransferencia son cualitativos. Existen los siguientes perfiles para las enfermedades autoinmunes sistémicas:

- a) **Perfil de anticuerpos antinucleares:** incluye anti-Ro/SSA 60kD, anti-Ro/SSA 52kD, anti-La/SSB, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl70, anti-Jo1, anti-RNP ribosomal, anti-PCNA, anti-histonas, anti-Pm/Scl, anti-nucleosomas y anti-proteínas centroméricas B.
- b) **Perfil de anticuerpos de polimiositis/dermatomiositis:** incluye anti-Jo1, anti-PL7, anti-PL12, anti-Ku, anti-Mi2, anti-Pm/Scl, anti-SSA/Ro 52 kD y anti-SRP.
- c) **Perfil de esclerosis sistémica:** Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, RP155, fibrillarina, NOR90, TRP155, fibrillarina To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, Ro-52 y PDGFR.

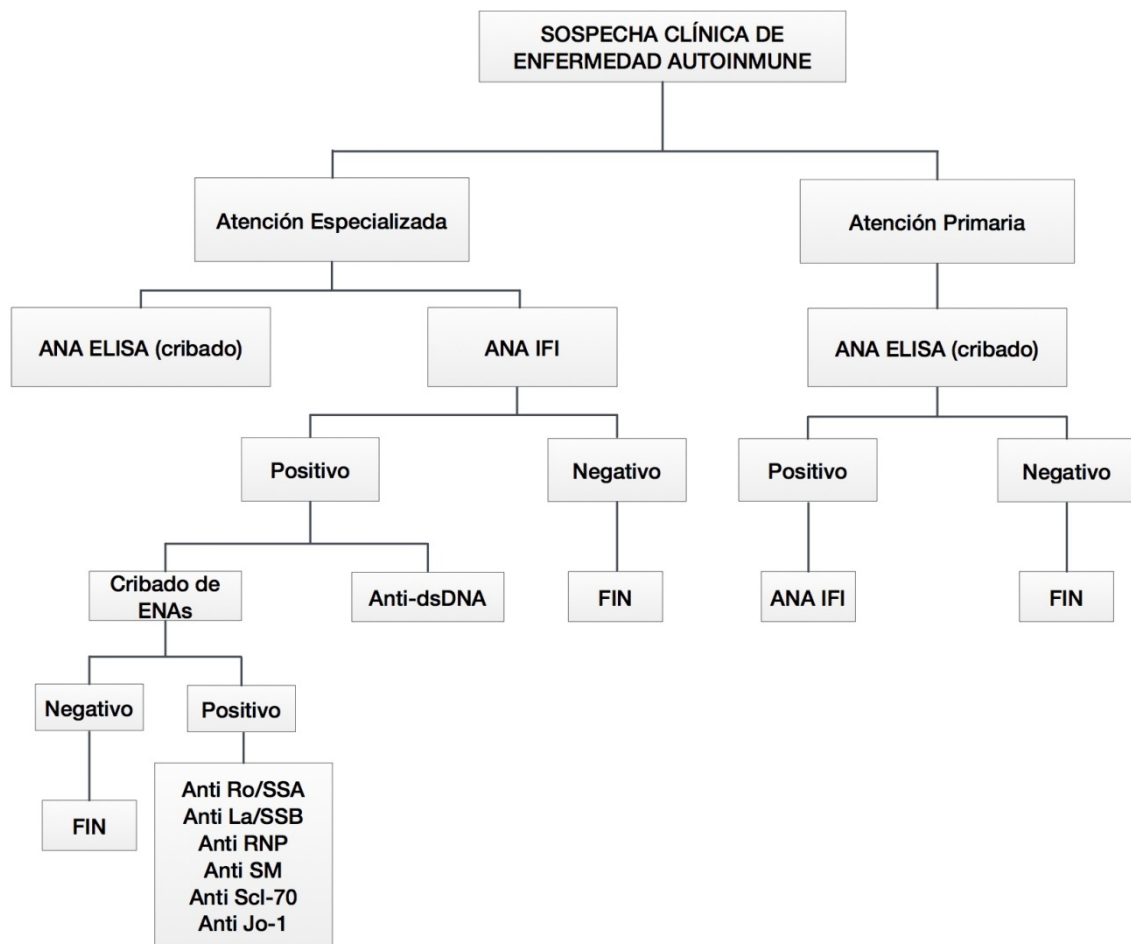


Figura 63. Protocolo de actuación ante un paciente con sospecha clínica de enfermedad autoinmune sistémica.

Anexo 7

Tablas de datos del estudio pronóstico

Datos para Anti-CCP con un punto de corte de 40 U/mL

Parámetros	Todos los pacientes (n=59) n (%)	Anti-CCP negativo (n=19) n (%)	Anti-CCP positivo (n=40) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género femenino	41 (70)	15 (79)	26 (65)	0,2
Erosiones articulares	42 (71)	13 (68)	29 (73)	0,7
HAQ ≥1	35 (59)	10 (53)	25 (63)	0,5
DAS28 ≥5,5	33 (56)	11 (58)	22 (55)	0,8
Pacientes que inician tratamiento con MTX	36 (61)	11 (58)	25 (63)	0,7

Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad	53 (42-59)	47 (33-57)	55 (46-60)	0,2
FR (UI/mL)	57,6 (20-115)	20 (20-47)	64 (37,3-143,9)	<0,0001
PCR (mg/L)	13,3 (6,3-31,4)	10,1 (4,14-32,5)	15 (6,5-31,4)	0,6
VSG (mm/h)	30 (13-50)	16 (10-43)	34 (22-52)	0,1
NAI	11 (4-16)	9 (5-14)	12 (5-17)	0,5
NAD	15 (4-20)	15 (5-20)	13 (4-20)	0,4
HAQ	1,35 (0,5-2)	1,20 (0,68-1,78)	1,38 (0,69-2,0)	0,6
DAS28	5,7 (4,1-6,6)	5,5 (4,6-6,4)	5,8 (4,0-6,8)	0,8

Tabla 49. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para los anticuerpos anti-CCP. Las variables están expresadas como proporciones n (%) y valores de mediana (IQR) ya sean cualitativas o cuantitativas, respectivamente. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

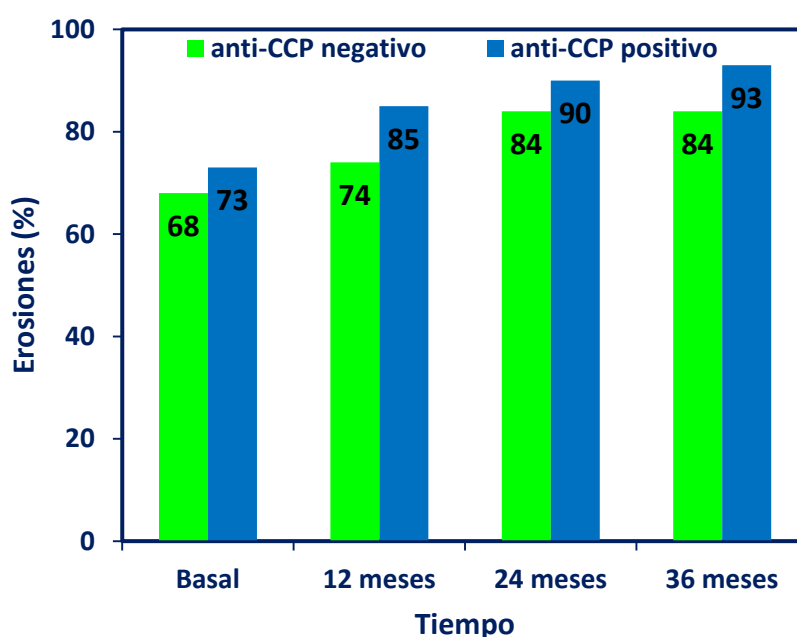


Figura 64. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento. Las barras representan el porcentaje de sujetos que presentan erosiones articulares en los grupos con anti-CCP negativos (≤ 40 U/mL) y anti-CCP positivos (> 40 U/mL).

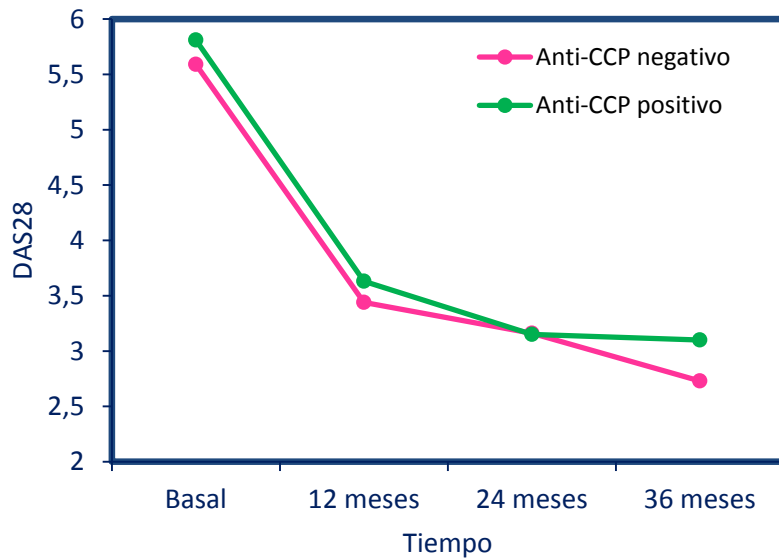


Figura 65. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 40 U/mL) y con anti-CCP positivo (> 40 U/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 40 U/mL.

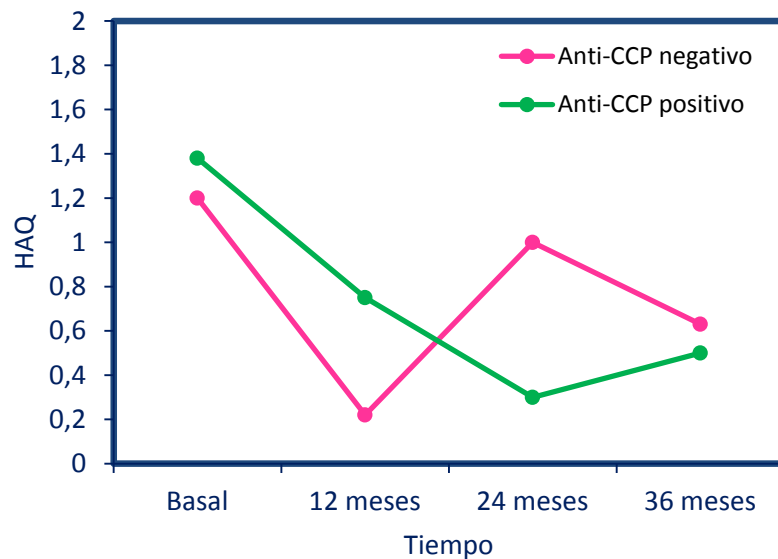


Figura 66. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 40 U/mL) y con anti-CCP positivo (> 40 U/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 40 U/mL.

Parámetros	Anti-CCP negativo (n=19)	Anti-CCP positivo (n=40)	
Erosiones	n (%)	n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Visita basal	13 (68)	29 (73)	0,7
12 meses	14 (74)	34 (85)	0,3
24 meses	16 (84)	36 (90)	0,5
36 meses	16 (84)	37 (93)	0,3
DAS28	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	5,5 (4,6-6,4)	5,8 (4,0-6,8)	0,8
12 meses	3,4 (2,2-4,7)	3,6 (2,8-4,8)	0,4
24 meses	3,1 (1,8-4,0)	3,1 (2,5-4,0)	0,5
36 meses	2,7 (2,1-3,3)	3,1 (2,2-3,8)	0,3
HAQ	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	1,20 (0,68-1,78)	1,38 (0,69-2,0)	0,6
12 meses	0,22 (0,0-1,34)	0,75 (0,3-1,5)	0,3
24 meses	1,0 (0,13-1,5)	0,3 (0,13-1,5)	0,6
36 meses	0,63 (0,0-1,38)	0,50 (0,14-1,23)	0,8

Tabla 50. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con anti-CCP negativo (≤ 40 U/mL) y con anti-CCP positivo (>40 U/mL) durante los 3 años de seguimiento. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para los anti-CCP al momento del diagnóstico. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con anti-CCP negativo y anti-CCP positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Datos para FR con un punto de corte de 20 UI/mL

Parámetros	Todos los pacientes (N=59) n (%)	FR negativo (N=15) n (%)	FR positivo (N=44) n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Género femenino	41 (70)	12 (80)	29 (66)	0,3
Erosiones articulares	42 (71)	10 (67)	32 (73)	0,7
HAQ ≥ 1	35 (59)	7 (47)	28 (64)	0,3
DAS28 $\geq 5,5$	33 (56)	7 (47)	26 (59)	0,4
Pacientes que inician tratamiento con MTX	36 (61)	10 (67)	26 (59)	0,6

Parámetros	Me (IQR)	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Edad	53 (42-59)	53 (39-63)	52 (43-59)	0,9
Anti-CCP (U/mL)	114 (26-247)	9 (4,5-107,5)	162 (59,8-257,8)	0,004
PCR (mg/L)	13,3 (6,3-31,4)	27,6 (5,75-43,7)	12,26 (6,4-25,6)	0,5
VSG (mm/h)	30 (13-50)	16 (11-46)	33 (20-50)	0,4
NAI	11 (4-16)	6 (3-14)	12 (6-17)	0,1
NAD	15 (4-20)	9 (4-18)	15 (4-21)	0,6
HAQ	1,35 (0,5-2)	1 (0,5-2,2)	1,4 (0,9-1,8)	0,8
DAS28	5,7 (4,1-6,6)	4,9 (3,9-6,5)	5,8 (4,4-6,7)	0,4

Tabla 51. Características basales de los pacientes con AR estratificados según la positividad para el FR. Las variables están expresadas como proporciones n (%) y valores de mediana (IQR) ya sean cualitativas o cuantitativas, respectivamente. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

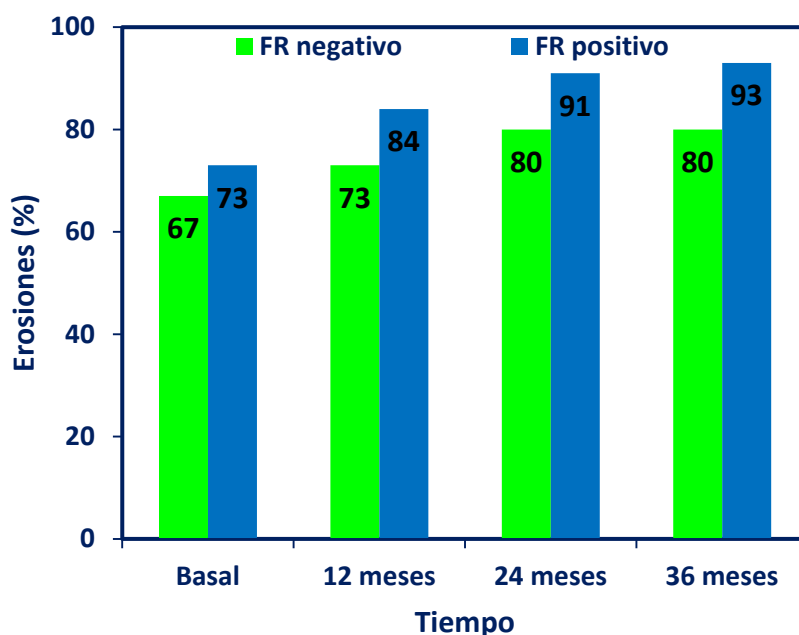


Figura 67. Erosiones articulares en la visita basal y a lo largo del seguimiento. Las barras representan el porcentaje de sujetos que presentan erosiones articulares en los grupos con FR negativo (≤ 20 UI/mL) y FR positivo (> 20 UI/mL).

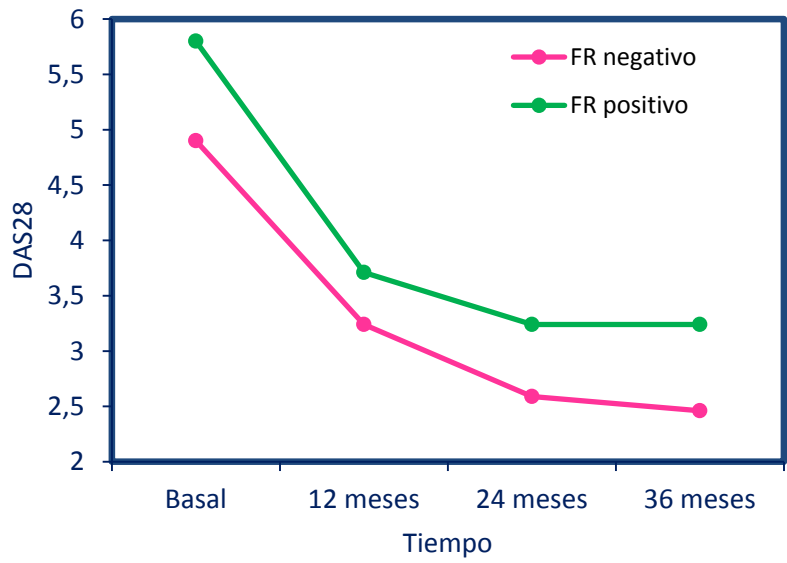


Figura 68. Evolución para el índice DAS28 a lo largo del seguimiento en los con FR negativo (≤ 20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 20 UI/mL.

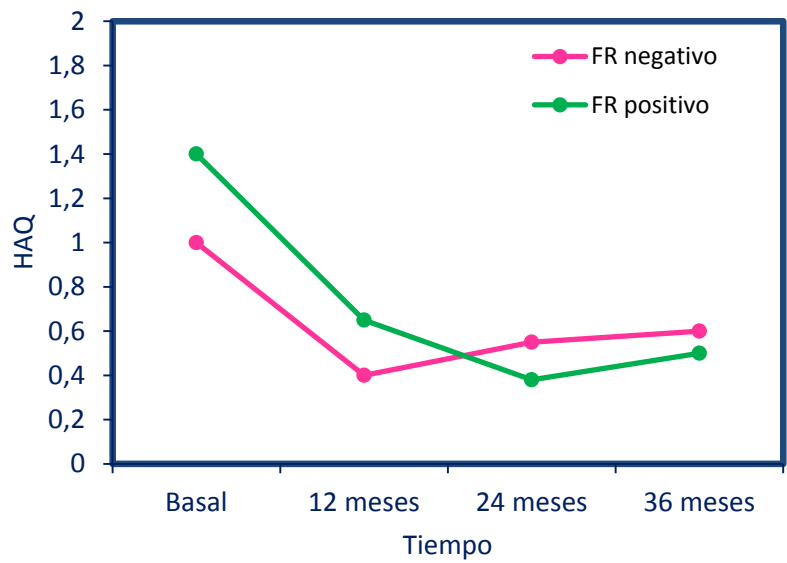


Figura 69. Evolución para el índice HAQ a lo largo del seguimiento en los pacientes con FR negativo (≤ 20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico según el punto de corte definido por 20 UI/mL.

Parámetros	FR negativo (n=15)	FR positivo (n=44)	
Erosiones	n (%)	n (%)	Valor p ⁽¹⁾
Visita basal	10 (67)	32 (73)	0,7
12 meses	11 (73)	37 (84)	0,4
24 meses	12 (80)	91 (40)	0,3
36 meses	12 (80)	93 (41)	0,1
DAS28	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	4,9 (3,9-6,5)	5,8 (4,4-6,7)	0,4
12 meses	3,2 (2,0-4,0)	3,7 (2,7-4,9)	0,2
24 meses	2,5 (1,8-3,5)	3,2 (2,4-4,3)	0,2
36 meses	2,4 (1,8-3,0)	3,2 (2,2-3,8)	0,04
HAQ	Me (IQR)	Me (IQR)	Valor p ⁽²⁾
Visita basal	1 (0,5-2,2)	1,4 (0,9-1,8)	0,8
12 meses	0,4 (0,14-1,15)	0,65 (0,19-1,56)	0,6
24 meses	0,55 (0,25-1,25)	0,38 (0,13-1,5)	0,8
36 meses	0,6 (0,14-1,13)	0,5 (0,08-1,3)	0,9

Tabla 52. Datos de las variables clínicas (erosiones, DAS28 y HAQ) recopilados para los pacientes con FR negativo (<20 UI/mL) y con FR positivo (>20 UI/mL) durante los 3 años de seguimiento. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según la positividad para el FR al momento del diagnóstico. El *valor p* hace referencia a la diferencia entre grupos con FR negativo y FR positivo. ⁽¹⁾ Prueba de Chi cuadrado. ⁽²⁾ Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Anexo 8

Comunicaciones a Congresos y Jornadas

9º Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, 7-9 Octubre 2015, Madrid

J.L. García De Veas Silva, C. González Rodriguez, B. Hernández Cruz. **Valor pronóstico de los anticuerpos contra péptidos y proteínas citrulinadas en pacientes con Artritis Reumatoide.** Libro de Comunicaciones (9º Congreso Nacional del Laboratorio Clínico) 2015.

8º Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, 15-17 Octubre 2014, Sevilla

J.L. García De Veas Silva, C. González Rodriguez, B. Hernández Cruz, F. Navarro Sarabia. **Factores genéticos (HLA-DRB1) y ambientales (Tabaquismo) en el desarrollo de anticuerpos contra péptidos citrulinados en Artritis Reumatoide.** Libro de Comunicaciones (8º Congreso Nacional del Laboratorio Clínico) 2014:11 (011). ISBN: 978-84-697-1164-4

XII Jornadas del Comité Científico (SEQC), 12-13 Mayo 2014, Madrid

CURSO: Artritis Reumatoide: Optimización de recursos e impacto de los nuevos fármacos.

PONENCIA PRESENTADA: **Relevancia de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo y pronóstico de la Artritis Reumatoide**

2014 American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, July 27-31, Chicago (USA)

J.L. García de Veas Silva, B. Hernández Cruz, C. González Rodriguez, V. Sánchez Margalet, F. Navarro Sarabia. **Diagnostic utility of autoantibodies and HLA-DRB1 Shared Epitope in patients with recent onset Rheumatoid Arthritis.** Clin Chem 2014;60(s10):S107 (A-365)

9th International Congress on Autoimmunity, Nice (France), March 26-30, 2014

García de Veas Silva J.; González Rodríguez C.; Hernández Cruz B.; Melguizo Madrid E.; Navarro Compán V.; Navarro Sarabia F. **Diagnostic value Of Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies And HLA-DRB1 Shared Epitope in Andalusian Patients With Rheumatoid Arthritis**

García de Veas Silva J.; González Rodríguez C.; Hernández Cruz B.; Melguizo Madrid E.; Navarro Compán V.; Navarro Sarabia F. **HLA-DRB1 Shared Epitope And Smoking In The Development Of Anti-cyclic Citrullinated Antibodies**

V Congreso Nacional de Laboratorio Clínico, 9-11 de Noviembre 2011, Málaga

García de Veas Silva JL, González Rodríguez C, Hernández Cruz B, Navarro Sarabia F. **Valor diagnóstico de los anti-CCP y el epitopo compartido HLA-DRB1 en pacientes andaluces con sospecha de artritis reumatoide.** Rev Lab Clin 2011;4(Esp congr):12 (A-0026). ISSN: 1888-4008

2011 American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, July 24-28, Atlanta (USA)

García de Veas Silva JL, González Rodríguez C, Hernández Cruz B, Navarro Sarabia F, Sánchez Margalet V, Fabiani Romero F. **Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 shared epitope in Andalusian patients with rheumatoid arthritis.** Clin Chem 2011;57(s10):A206 (E-106)



VIII

Bibliografía

- (1) Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain *Rheumatology (Oxford)* 2002 Jan;41(1):88-95.
- (2) Naz SM, Symmons DP. Mortality in established rheumatoid arthritis *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007 Oct;21(5):871-883.
- (3) Navarro-Cano G, Del Rincon I, Pogosian S, Roldan JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity *Arthritis Rheum* 2003 Sep;48(9):2425-2433.
- (4) Choy EHS, Panayi GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2001 03/22; 2014/07;344(12):907-916.
- (5) Firestein GS. Inhibiting Inflammation in Rheumatoid Arthritis *N Engl J Med* 2006;354(1):80-82.
- (6) McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011 12/08; 2014/07;365(23):2205-2219.
- (7) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1988 Mar;31(3):315-324.
- (8) Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M, et al. Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease *J Rheumatol* 2002 Nov;29(11):2278-2287.
- (9) van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, et al. The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial *Ann Intern Med* 1996 Apr 15;124(8):699-707.
- (10) Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration *Arthritis Rheum* 2000 Jan;43(1):22-29.
- (11) Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2003 Jul;48(7):1771-1774.
- (12) Raza K, Buckley CE, Salmon M, Buckley CD. Treating very early rheumatoid arthritis *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 Oct;20(5):849-863.
- (13) Huizinga TW, Machold KP, Breedveld FC, Lipsky PE, Smolen JS. Criteria for early rheumatoid arthritis: from Bayes' law revisited to new thoughts on pathogenesis *Arthritis Rheum* 2002 May;46(5):1155-1159.
- (14) van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol* 1995 Nov;34 Suppl 2:74-78.
- (15) van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, van de Putte LB. Radiographic progression on radiographs of hands and feet during the first 3 years of rheumatoid arthritis measured according to Sharp's method (van der Heijde modification) *J Rheumatol* 1995 Sep;22(9):1792-1796.
- (16) Banal F, Dougados M, Combescure C, Gossec L. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis *Ann Rheum Dis* 2009 Jul;68(7):1184-1191.
- (17) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative *Arthritis Rheum* 2010 Sep;62(9):2569-2581.
- (18) Van der Linden MPM, Knevel R, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010

American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):37-42.

(19) Plant MJ, Williams AL, O'Sullivan MM, Lewis PA, Coles EC, Jessop JD. Relationship between time-integrated C-reactive protein levels and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2000 Jul;43(7):1473-1477.

(20) van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van der Heijde DM, Te Meerman GJ, van Riel PL, Houtman PM, et al. The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease *Br J Rheumatol* 1993 Jun;32 Suppl 3:9-13.

(21) Graudal N, Tarp U, Jurik AG, Galloe AM, Garred P, Milman N, et al. Inflammatory patterns in rheumatoid arthritis estimated by the number of swollen and tender joints, the erythrocyte sedimentation rate, and hemoglobin: longterm course and association to radiographic progression *J Rheumatol* 2000 Jan;27(1):47-57.

(22) Yildirim K, Karatay S, Melikoglu MA, Gureser G, Ugur M, Senel K. Associations between acute phase reactant levels and disease activity score (DAS28) in patients with rheumatoid arthritis *Ann Clin Lab Sci* 2004 Autumn;34(4):423-426.

(23) Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2005 Feb;64(2):196-201.

(24) Lane SK, Gravel JW, Jr. Clinical utility of common serum rheumatologic tests *Am Fam Physician* 2002 Mar 15;65(6):1073-1080.

(25) Nam J, Villeneuve E, Emery P. The role of biomarkers in the management of patients with rheumatoid arthritis *Curr Rheumatol Rep* 2009 Oct;11(5):371-377.

(26) Wolfe F, Michaud K. The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate *J Rheumatol* 1994 Jul;21(7):1227-1237.

(27) Sokka T, Pincus T. Most patients receiving routine care for rheumatoid arthritis in 2001 did not meet inclusion criteria for most recent clinical trials or american college of rheumatology criteria for remission *J Rheumatol* 2003 Jun;30(6):1138-1146.

(28) Kushner I. C-reactive protein in rheumatology *Arthritis Rheum* 1991 Aug;34(8):1065-1068.

(29) Miller A, Green M, Robinson D. Simple rule for calculating normal erythrocyte sedimentation rate *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983 Jan 22;286(6361):266.

(30) Wener MH, Daum PR, McQuillan GM. The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration *J Rheumatol* 2000 Oct;27(10):2351-2359.

(31) van der Heijde DM, van Riel PL, van Leeuwen MA, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of 147 patients *Br J Rheumatol* 1992 Aug;31(8):519-525.

(32) Matsui T, Kuga Y, Kaneko A, Nishino J, Eto Y, Chiba N, et al. Disease Activity Score 28 (DAS28) using C-reactive protein underestimates disease activity and overestimates EULAR response criteria compared with DAS28 using erythrocyte sedimentation rate in a large observational cohort of rheumatoid arthritis patients in Japan *Ann Rheum Dis* 2007 Sep;66(9):1221-1226.

(33) Kirwan JR. Conceptual issues in scoring radiographic progression in rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1999 Mar;26(3):720-725.

(34) de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:21-25.

(35) Klareskog L, Widhe M, Hermansson M, Ronnelid J. Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise *Curr Opin Rheumatol* 2008 May;20(3):300-305.

- (36) van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis *Curr Opin Rheumatol* 2005 May;17(3):299-304.
- (37) Kuru O, Bilgici A, Birinci A, Ulusoy H, Durupinar B. Prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Bratisl Lek Listy*. 2009 Jan;110(10):650-4.
- (38) Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2000 Aug;43(8):1831-1835.
- (39) Tornero Molina J, Sanmarti Sala R, Rodriguez Valverde V, Martin Mola E, Marenco de la Fuente JL, Gonzalez Alvaro I, et al. Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis *Reumatol Clin* 2010 Jan-Feb;6(1):23-36.
- (40) MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins *Arthritis Rheum* 2000 Jan;43(1):30-37.
- (41) Karlson EW, Chang SC, Cui J, Chibnik LB, Fraser PA, De Vivo I, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2010 Jan;69(1):54-60.
- (42) Criswell LA, Saag KG, Mikuls TR, Cerhan JR, Merlino LA, Lum RF, et al. Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women *Ann Rheum Dis* 2006 Sep;65(9):1163-1167.
- (43) Bali D, Gourley S, Kostyu DD, Goel N, Bruce I, Bell A, et al. Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families *Genes Immun* 1999 Sep;1(1):28-36.
- (44) Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1999 Jun;42(6):1071-1079.
- (45) Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1999 Jun;42(6):1071-1079.
- (46) MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins *Arthritis Rheum* 2000 Jan;43(1):30-37.
- (47) Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis *Genes Immun* 2004 May;5(3):151-157.
- (48) Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility *Rheumatology (Oxford)* 2008 Apr;47(4):399-402.
- (49) Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis *Annu Rev Pathol* 2009;4:417-434.
- (50) McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1977 Jun;20(5):1037-1042.
- (51) Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis *N Engl J Med* 1978 Apr 20;298(16):869-871.
- (52) Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis *J Clin Invest* 1976 May;57(5):1148-1157.
- (53) Ollier WE, Harrison B, Symmons D. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001 Mar;15(1):27-48.
- (54) Woodrow JC, Nichol FE, Zaphiropoulos G. DR antigens and rheumatoid arthritis: a study of two populations *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981 Nov 14;283(6302):1287-1288.

- (55) Sanchez B, Moreno I, Magarino R, Garzon M, Gonzalez MF, Garcia A, et al. HLA-DRw10 confers the highest susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population *Tissue Antigens* 1990 Oct;36(4):174-176.
- (56) Juan MD, Belmonte I, Barado J, Laso JM, Figueroa M, Arnaiz-Villena A, et al. Differential associations of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: High frequency of DR1 and DR10 and lack of association with HLA-DR4 or any of its subtypes *Tissue Antigens* 1994;43(5):320-323.
- (57) Boots AM, Hubers H, Kouwijzer M, den Hoed-van Zandbrink L, Westrek-Esselink BM, van Doorn C, et al. Identification of an altered peptide ligand based on the endogenously presented, rheumatoid arthritis-associated, human cartilage glycoprotein-39(263-275) epitope: an MHC anchor variant peptide for immune modulation *Arthritis Res Ther* 2007;9(4):R71.
- (58) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1987 Nov;30(11):1205-1213.
- (59) Gregersen PK, Moriuchi T, Karr RW, Obata F, Moriuchi J, Maccari J, et al. Polymorphism of HLA-DR beta chains in DR4, -7, and -9 haplotypes: implications for the mechanisms of allelic variation *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Dec;83(23):9149-9153.
- (60) Gregersen PK, Shen M, Song QL, Merryman P, Degar S, Seki T, et al. Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Apr;83(8):2642-2646.
- (61) Gorman JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Criswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients *Arthritis Rheum* 2004 Feb;50(2):400-412.
- (62) Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 2005;7(6):R1386-93.
- (63) Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, et al. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis *QJM* 1996 Nov;89(11):821-829.
- (64) Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature *Semin Arthritis Rheum* 2005 Feb;34(4):662-667.
- (65) Willkens RF, Nepom GT, Marks CR, Nettles JW, Nepom BS. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis *Arthritis Rheum* 1991 Jan;34(1):43-47.
- (66) Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010 *Tissue Antigens* 2010 Apr;75(4):291-455.
- (67) Lee KW, Park MH. New HLA nomenclature (2010) and its clinical application in Koreans. *Korean J Lab Med.* 2010;30(3):203-17
- (68) Ronningen KS, Spurkland A, Egeland T, Iwe T, Munthe E, Vartdal F, et al. Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74 *Tissue Antigens* 1990 Nov;36(5):235-240.
- (69) Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias *Arthritis Rheum* 2002 Sep;46(9):2320-2329.
- (70) Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Dec;86(24):10049-10053.
- (71) Ohta N, Nishimura YK, Tanimoto K, Horiuchi Y, Abe C, Shiokawa Y, et al. Association between HLA and Japanese patients with rheumatoid arthritis *Hum Immunol* 1982 Oct;5(2):123-132.

- (72) Molckentin J, Gregersen PK, Lin X, Zhu N, Wang Y, Wang Y, et al. Molecular analysis of HLA-DR beta and DQ beta polymorphism in Chinese with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1993 Aug;52(8):610-612.
- (73) Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, et al. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population *Arthritis Rheum* 1993 Jun;36(6):811-814.
- (74) Schiff B, Mizrahi Y, Orgad S, Yaron M, Gazit E. Association of HLA-Aw31 and HLA-DR1 with adult rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1982 Aug;41(4):403-404.
- (75) de Vries N, Ronningen KS, Tilanus MG, Bouwens-Rombouts A, Segal R, Egeland T, et al. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype *Tissue Antigens* 1993 Jan;41(1):26-30.
- (76) Kapitany A, Zilahi E, Szanto S, Szucs G, Szabo Z, Vegvari A, et al. Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary *Ann N Y Acad Sci* 2005 Jun;1051:263-270.
- (77) Williams RC, Jacobsson LT, Knowler WC, del Puente A, Kostyu D, McAuley JE, et al. Meta-analysis reveals association between most common class II haplotype in full-heritage Native Americans and rheumatoid arthritis *Hum Immunol* 1995 Jan;42(1):90-94.
- (78) Harvey J, Lotze M, Arnett FC, Bias WB, Billingsley LM, Harvey E, et al. Rheumatoid arthritis in a Chippewa band. II. Field study with clinical serologic and HLA-D correlations *J Rheumatol* 1983 Feb;10(1):28-32.
- (79) Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1997 Feb;40(2):341-351.
- (80) Nepom GT, Gersuk V, Nepom BS. Prognostic implications of HLA genotyping in the early assessment of patients with rheumatoid arthritis *J Rheumatol Suppl* 1996 Mar;44:5-9.
- (81) Meyer JM, Evans TI, Small RE, Redford TW, Han J, Singh R, et al. HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1999 May;26(5):1024-1034.
- (82) Valenzuela A, Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Moreno I, Garcia A, Núñez-Roldan A. Association of HLA shared epitope with joint damage progression in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 1999 Mar;60(3):250-4.
- (83) Young A, Jaraquemada D, Awad J, Festenstein H, Corbett M, Hay FC, et al. Association of HLA-DR4/Dw4 and DR2/Dw2 with radiologic changes in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. Preferential relationship with HLA-Dw rather than HLA-DR specificities *Arthritis Rheum* 1984 Jan;27(1):20-25.
- (84) Calin A, Elswood J, Klouda PT. Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. Susceptibility versus severity, a case-control study *Arthritis Rheum* 1989 Oct;32(10):1221-1225.
- (85) van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, Schreuder GM, D'Amaro J, et al. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. Results of a followup study *Arthritis Rheum* 1991 Jul;34(7):822-830.
- (86) Wakitani S, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Kaneshige T, Nishimura Y, et al. The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese *Br J Rheumatol* 1997 Jun;36(6):630-636.
- (87) Kim HY, Min JK, Yang HI, Park SH, Hong YS, Jee WH, et al. The impact of HLA-DRB1*0405 on disease severity in Korean patients with seropositive rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol* 1997 Apr;36(4):440-443.
- (88) Eberhardt K, Fex E, Johnson U, Wollheim FA. Associations of HLA-DRB and -DQB genes with two and five year outcome in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1996 Jan;55(1):34-39.

- (89) Valenzuela-Castano A, Garcia-Lopez A, Perez-Vilches D, Rodriguez-Perez R, Gonzalez-Escribano MF, Nunez-Roldan A. The predictive value of the HLA shared epitope for severity of radiological joint damage in patients with rheumatoid arthritis. A 10 year observational prospective study *J Rheumatol* 2000 Mar;27(3):571-574.
- (90) Rau R, Herborn G, Zueger S, Fenner H. The effect of HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor, and treatment on radiographic disease progression in rheumatoid arthritis over 6 years *J Rheumatol* 2000 Nov;27(11):2566-2575.
- (91) Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis *PLoS Genet* 2008 Apr 25;4(4):e1000024.
- (92) Wordsworth P, Pile KD, Buckely JD, Lanchbury JS, Ollier B, Lathrop M, et al. HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis *Am J Hum Genet* 1992 Sep;51(3):585-591.
- (93) O'Dell JR, Nepom BS, Haire C, Gersuk VH, Gaur L, Moore GF, et al. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments *Ann Rheum Dis* 1998 Apr;57(4):209-213.
- (94) Criswell LA, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J, et al. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept *Arthritis Rheum* 2004 Sep;50(9):2750-2756.
- (95) Wucherpfennig KW, Strominger JL. Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases *J Exp Med* 1995 May 1;181(5):1597-1601.
- (96) La Cava A, Nelson JL, Ollier WE, MacGregor A, Keystone EC, Thorne JC, et al. Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis *J Clin Invest* 1997 Aug 1;100(3):658-663.
- (97) Bhayani HR, Hedrick SM. The role of polymorphic amino acids of the MHC molecule in the selection of the T cell repertoire *J Immunol* 1991 Feb 15;146(4):1093-1098.
- (98) Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis *Scand J Immunol* 1988 Apr;27(4):367-371.
- (99) Zanelli E, Huizinga TW, Guerne PA, Vischer TL, Tiercy JM, Verduyn W, et al. An extended HLA-DQ-DR haplotype rather than DRB1 alone contributes to RA predisposition *Immunogenetics* 1998 Nov-Dec;48(6):394-401.
- (100) van der Horst-Bruinsma IE, Visser H, Hazes JM, Breedveld FC, Verduyn W, Schreuder GM, et al. HLA-DQ-associated predisposition to and dominant HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis *Hum Immunol* 1999 Feb;60(2):152-158.
- (101) Pascual M, Nieto A, Lopez-Nevot MA, Ramal L, Mataran L, Caballero A, et al. Rheumatoid arthritis in southern Spain: toward elucidation of a unifying role of the HLA class II region in disease predisposition *Arthritis Rheum* 2001 Feb;44(2):307-314.
- (102) van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR, Toes RE. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility *Arthritis Rheum* 2005 Sep;52(9):2637-2644.
- (103) Carrier N, Cossette P, Daniel C, de Brum-Fernandes A, Liang P, Menard HA, et al. The DERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies *Arthritis Rheum* 2009 Mar;60(3):698-707.
- (104) Balsa A, Cabezon A, Orozco G, Cobo T, Miranda-Carus E, Lopez-Nevot MA, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor *Arthritis Res Ther* 2010;12(2):R62.

- (105) Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 1;95(18):10746-10750.
- (106) Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y, Goko H, Kawasaki H, Wada T, et al. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis *Int Immunol* 1998 Dec;10(12):1891-1895.
- (107) Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, et al. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites *Hum Mol Genet* 2005 Aug 15;14(16):2305-2321.
- (108) John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M, Chen W, et al. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites *Am J Hum Genet* 2004 Jul;75(1):54-64.
- (109) Osorio Y, Fortea J, Bukulmez H, Petit-Teixeira E, Michou L, Pierlot C, Cailleau-Moindrault S, et al. Dense genome-wide linkage analysis of rheumatoid arthritis, including covariates *Arthritis Rheum* 2004 Sep;50(9):2757-2765.
- (110) Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C, et al. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: A replication study and combined analysis of 512 multicase families *Arthritis & Rheumatism* 2003;48(4):906-916.
- (111) Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Monteiro J, et al. A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases *Am J Hum Genet* 2001 Apr;68(4):927-936.
- (112) MacKay K, Eyre S, Myerscough A, Milicic A, Barton A, Laval S, et al. Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom *Arthritis Rheum* 2002 Mar;46(3):632-639.
- (113) Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:16-20.
- (114) Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls *Nature* 2007 Jun 7;447(7145):661-678.
- (115) Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study *N Engl J Med* 2007 Sep 20;357(12):1199-1209.
- (116) Hill RJ, Zozulya S, Lu YL, Ward K, Gishizky M, Jallal B. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation *Exp Hematol* 2002 Mar;30(3):237-244.
- (117) Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes *Nat Genet* 2004 Apr;36(4):337-338.
- (118) Gregersen PK. Pathways to gene identification in rheumatoid arthritis: PTPN22 and beyond *Immunol Rev* 2005 Apr;204:74-86.
- (119) Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity *Nat Immunol* 2012;13(5):439-447.
- (120) Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, 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* 2004 Aug;75(2):330-337.
- (121) Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant *Nat Genet* 2005 Dec;37(12):1317-1319.
- (122) Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences *J Autoimmun* 2009 May-Jun;32(3-4):158-162.

- (123) Chung SA, Criswell LA. PTPN22: its role in SLE and autoimmunity *Autoimmunity* 2007 Dec;40(8):582-590.
- (124) Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, Dimopoulou K, Cosmidis N, Voloudakis G, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete Lupus 2011 Apr;20(5):501-506.
- (125) Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene *Arthritis Rheum* 2005 Jun;52(6):1694-1699.
- (126) Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4 *Immunol Rev* 2004 Dec;202:139-156.
- (127) Morinobu A, Gadina M, Strober W, Visconti R, Fornace A, Montagna C, et al. STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Sep 17;99(19):12281-12286.
- (128) Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells *J Immunol* 2007 Apr 15;178(8):4901-4907.
- (129) Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus *N Engl J Med* 2007 Sep 6;357(10):977-986.
- (130) Finnegan A, Grusby MJ, Kaplan CD, O'Neill SK, Eibel H, Koreny T, et al. IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms *J Immunol* 2002 Sep 15;169(6):3345-3352.
- (131) Lee HS, Remmers EF, Le JM, Kastner DL, Bae SC, Gregersen PK. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population *Mol Med* 2007 Sep-Oct;13(9-10):455-460.
- (132) Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages *Ann Rheum Dis* 2004 Apr;63(4):373-381.
- (133) Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S, et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2005 Jan;44(1):40-50.
- (134) Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation *Arthritis Rheum* 2007 Nov;56(11):3541-3553.
- (135) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis *Nat Genet* 2003 Aug;34(4):395-402.
- (136) Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population *Ann Rheum Dis* 2005 Apr;64(4):587-593.
- (137) Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Lamas JR, Fernandez-Arquero M, Balsa A, et al. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population *Rheumatology (Oxford)* 2005 Oct;44(10):1263-1266.
- (138) Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population *Arthritis Rheum* 2004 Apr;50(4):1117-1121.
- (139) Burr ML, Naseem H, Hinks A, Eyre S, Gibbons LJ, Bowes J, et al. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population *Ann Rheum Dis* 2010 Apr;69(4):666-670.

- (140) Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans *Arthritis Rheum* 2006 Jan;54(1):90-96.
- (141) Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4 *Am J Hum Genet* 2005 Dec;77(6):1044-1060.
- (142) Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis *Nat Rev Genet* 2006 Dec;7(12):917-928.
- (143) Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis *Nat Genet* 2007 Dec;39(12):1477-1482.
- (144) Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23 *Nat Genet* 2007 Dec;39(12):1431-1433.
- (145) Orozco G, Hinks A, Eyre S, Ke X, Gibbons LJ, Bowes J, et al. Combined effects of three independent SNPs greatly increase the risk estimate for RA at 6q23 *Hum Mol Genet* 2009 Jul 15;18(14):2693-2699.
- (146) Karlson EW, Deane K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis *Rheum Dis Clin North Am* 2012 May;38(2):405-426.
- (147) Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis *Curr Opin Rheumatol* 2009 May;21(3):279-283.
- (148) Ansar Ahmed S, Dauphinee MJ, Talal N. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice *J Immunol* 1985 Jan;134(1):204-210.
- (149) Nelson JL, Hughes KA, Smith AG, Nisperos BB, Branchaud AM, Hansen JA. Remission of rheumatoid arthritis during pregnancy and maternal-fetal class II alloantigen disparity *Am J Reprod Immunol* 1992 Oct-Dec;28(3-4):226-227.
- (150) Nelson JL, Hughes KA, Smith AG, Nisperos BB, Branchaud AM, Hansen JA. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis *N Engl J Med* 1993 Aug 12;329(7):466-471.
- (151) Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Turesson C. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2012 Mar;71(3):378-381.
- (152) Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2009 Apr;68(4):526-530.
- (153) Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study *Arthritis Rheum* 2004 Nov;50(11):3458-3467.
- (154) Heikkila R, Aho K, Heliövaara M, Knekt P, Reunanen A, Aromaa A, et al. Serum androgen-anabolic hormones and the risk of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1998 May;57(5):281-285.
- (155) Tengstrand B, Carlstrom K, Hafstrom I. Bioavailable testosterone in men with rheumatoid arthritis-high frequency of hypogonadism *Rheumatology (Oxford)* 2002 Mar;41(3):285-289.
- (156) Tengstrand B, Carlstrom K, Fellander-Tsai L, Hafstrom I. Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation *J Rheumatol* 2003 Nov;30(11):2338-2343.

- (157) Jawaheer D, Lum RF, Gregersen PK, Criswell LA. Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2006 Oct;54(10):3087-3094.
- (158) Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes *Eur J Endocrinol* 2001 Sep;145(3):351-357.
- (159) Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus *Autoimmun Rev* 2006 Feb;5(2):114-117.
- (160) Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis *JAMA* 2006 Dec 20;296(23):2832-2838.
- (161) Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations *Ann Rheum Dis* 2007 Sep;66(9):1137-1142.
- (162) Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study *Arthritis Rheum* 2004 Jan;50(1):72-77.
- (163) Patel S, Farragher T, Berry J, Bunn D, Silman A, Symmons D. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis *Arthritis Rheum* 2007 Jul;56(7):2143-2149.
- (164) Haque UJ, Bartlett SJ. Relationships among vitamin D, disease activity, pain and disability in rheumatoid arthritis *Clin Exp Rheumatol* 2010 Sep-Oct;28(5):745-747.
- (165) Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women *Ann Rheum Dis* 2008 Apr;67(4):530-535.
- (166) James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):343S-8S.
- (167) Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases *J Am Coll Nutr* 2002 Dec;21(6):495-505.
- (168) Stamp LK, James MJ, Cleland LG. Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature *Semin Arthritis Rheum* 2005 Oct;35(2):77-94.
- (169) Rosell M, Wesley AM, Rydin K, Klareskog L, Alfredsson L, EIRA study group. Dietary fish and fish oil and the risk of rheumatoid arthritis *Epidemiology* 2009 Nov;20(6):896-901.
- (170) Pedersen M, Stripp C, Klarlund M, Olsen SF, Tjonneland AM, Frisch M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort *J Rheumatol* 2005 Jul;32(7):1249-1252.
- (171) Benito-Garcia E, Feskanich D, Hu FB, Mandl LA, Karlson EW. Protein, iron, and meat consumption and risk for rheumatoid arthritis: a prospective cohort study *Arthritis Res Ther* 2007;9(1):R16.
- (172) Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2003 Nov;48(11):3055-3060.
- (173) Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Merlino L, Mudano AS, Burma M, et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study *Arthritis Rheum* 2002 Jan;46(1):83-91.
- (174) Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides *Arthritis Res Ther* 2006;8(4):R133.

- (175) Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies *Ann Rheum Dis* 2009 Feb;68(2):222-227.
- (176) Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides *Arthritis Res Ther* 2006;8(4):R133.
- (177) Scott IC, Tan R, Stahl D, Steer S, Lewis CM, Cope AP. The protective effect of alcohol on developing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis *Rheumatology (Oxford)* 2013 May;52(5):856-867.
- (178) Nissen MJ, Gabay C, Scherer A, Finckh A, Swiss Clinical Quality Management Project in Rheumatoid Arthritis. The effect of alcohol on radiographic progression in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2010 May;62(5):1265-1272.
- (179) Bergstrom U, Jacobsson LT, Nilsson JA, Wirfalt E, Turesson C. Smoking, low formal level of education, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis *Scand J Rheumatol* 2013;42(2):123-130.
- (180) Stolt P, Kallberg H, Lundberg I, Sjogren B, Klareskog L, Alfredsson L, et al. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study *Ann Rheum Dis* 2005 Apr;64(4):582-586.
- (181) Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Kallberg H, Ronnelid J, Lundberg I, et al. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2010 Jun;69(6):1072-1076.
- (182) Bengtsson C, Nordmark B, Klareskog L, Lundberg I, Alfredsson L, EIRA Study Group. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study *Ann Rheum Dis* 2005 Nov;64(11):1588-1594.
- (183) Bergstrom U, Jacobsson LT, Nilsson JA, Berglund G, Turesson C. Pulmonary dysfunction, smoking, socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2011 Nov;50(11):2005-2013.
- (184) Ebringer A, Khalafpour S, Wilson C. Rheumatoid arthritis and Proteus: a possible aetiological association *Rheumatol Int* 1989;9(3-5):223-228.
- (185) Holoshitz J, Klajman A, Drucker I, Lapidot Z, Yaretsky A, Frenkel A, et al. T lymphocytes of rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacteria cross-reactive with cartilage *Lancet* 1986 Aug 9;2(8502):305-309.
- (186) Venables P. Epstein-Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1988 Apr;47(4):265-269.
- (187) Deighton CM, Gray J, Bint AJ, Walker DJ. Specificity of the proteus antibody response in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1992 Nov;51(11):1206-1207.
- (188) Hoffman RW, O'Sullivan FX, Schafermeyer KR, Moore TL, Roussel D, Watson-McKown R, et al. Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis: analysis of their relationship using immunoblotting and an ultrasensitive polymerase chain reaction detection method *Arthritis Rheum* 1997 Jul;40(7):1219-1228.
- (189) Gilroy CB, Keat A, Taylor-Robinson D. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides *Rheumatology (Oxford)* 2001 Dec;40(12):1355-1358.
- (190) Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis *Immunol Rev* 2010 Jan;233(1):34-54.

- (191) La Cava A, Nelson JL, Ollier WE, MacGregor A, Keystone EC, Thorne JC, et al. Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis *J Clin Invest* 1997 Aug 1;100(3):658-663.
- (192) Balandraud N, Meynard JB, Auger I, Sovran H, Mugnier B, Revirion D, et al. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction *Arthritis Rheum* 2003 May;48(5):1223-1228.
- (193) van Eden W, Thole JE, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis *Nature* 1988 Jan 14;331(6152):171-173.
- (194) Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC, et al. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis *Nat Med* 1995 May;1(5):448-452.
- (195) Costenbader KH, Karlson EW. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* 2006;15(11):737-745.
- (196) Hernandez Avila M, Liang MH, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, et al. Reproductive factors, smoking, and the risk for rheumatoid arthritis *Epidemiology* 1990 Jul;1(4):285-291.
- (197) Bengtsson AA, Rylander L, Hagmar L, Nived O, Sturfelt G. Risk factors for developing systemic lupus erythematosus: a case-control study in southern Sweden *Rheumatology (Oxford)* 2002 May;41(5):563-571.
- (198) Pugliatti M, Harbo HF, Holmoy T, Kampman MT, Myhr KM, Riise T, et al. Environmental risk factors in multiple sclerosis *Acta Neurol Scand Suppl* 2008;188:34-40.
- (199) Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis *Neurology* 2009 Sep 1;73(9):696-701.
- (200) Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients *Hepatology* 2005 Nov;42(5):1194-1202.
- (201) Matthey DL, Dawson SR, Healey EL, Packham JC. Relationship between smoking and patient-reported measures of disease outcome in ankylosing spondylitis *J Rheumatol* 2011 Dec;38(12):2608-2615.
- (202) Li W, Han J, Qureshi AA. Smoking and risk of incident psoriatic arthritis in US women *Ann Rheum Dis* 2012 Jun;71(6):804-808.
- (203) Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women *Am J Gastroenterol* 2012 Sep;107(9):1399-1406.
- (204) Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis *Contraception* 1987 May;35(5):457-464.
- (205) Uhlig T, Hagen KB, Kvien TK. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1999 Jan;26(1):47-54.
- (206) Reckner Olsson A, Skogh T, Wingren G. Comorbidity and lifestyle, reproductive factors, and environmental exposures associated with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2001 Oct;60(10):934-939.
- (207) Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA *Ann Rheum Dis* 2001 Mar;60(3):223-227.

- (208) Heliövaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1993 Nov;20(11):1830-1835.
- (209) Hazes JM, Dijkmans BA, Vandenbroucke JP, de Vries RR, Cats A. Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption *Ann Rheum Dis* 1990 Dec;49(12):980-982.
- (210) Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England *Arthritis Rheum* 1997 Nov;40(11):1955-1961.
- (211) Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL, Dugowson CE, Daling JR. Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis *Epidemiology* 1994 Sep;5(5):525-532.
- (212) Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, 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* 2003 Sep;62(9):835-841.
- (213) Krishnan E, Sokka T, Hannonen P. Smoking-gender interaction and risk for rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 2003;5(3):R158-62.
- (214) Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women *Am J Med* 2006 Jun;119(6):503.e1-503.e9.
- (215) Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL, Dugowson CE, Daling JR. Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis *Epidemiology* 1994 Sep;5(5):525-532.
- (216) Karlson EW, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals *Arthritis Rheum* 1999 May;42(5):910-917.
- (217) Olsson AR, Skogh T, Wingren G. Aetiological factors of importance for the development of rheumatoid arthritis *Scand J Rheumatol* 2004;33(5):300-306.
- (218) Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies *Ann Rheum Dis* 2010 Jan;69(1):70-81.
- (219) Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity *Ann Rheum Dis* 1997 Aug;56(8):463-469.
- (220) Nyhall-Wahlin BM, Jacobsson LT, Petersson IF, Turesson C, BARFOT study group. Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2006 May;65(5):601-606.
- (221) Struthers GR, Scott DL, Delamere JP, Sheppard H, Kitt M. Smoking and rheumatoid vasculitis *Rheumatol Int* 1981;1(3):145-146.
- (222) Nagai S, Hoshino Y, Hayashi M, Ito I. Smoking-related interstitial lung diseases *Curr Opin Pulm Med* 2000 Sep;6(5):415-419.
- (223) Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years *Ann Rheum Dis* 2003 Aug;62(8):722-727.
- (224) Wolfe F. The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 2000 Mar;27(3):630-637.

- (225) Masdottir B, Jonsson T, Manfredsdottir V, Vikingsson A, Brekkan A, Valdimarsson H. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2000 Nov;39(11):1202-1205.
- (226) Papadopoulos NG, Alamanos Y, Voulgari PV, Epagelis EK, Tsifetaki N, Drosos AA. Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients? *Clin Exp Rheumatol* 2005 Nov-Dec;23(6):861-866.
- (227) Matthey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, et al. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus *Arthritis Rheum* 2002 Mar;46(3):640-646.
- (228) Manfredsdottir VF, Vikingsdottir T, Jonsson T, Geirsson AJ, Kjartansson O, Heimisdottir M, et al. The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2006 Jun;45(6):734-740.
- (229) Westhoff G, Rau R, Zink A. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group *Rheumatology (Oxford)* 2008 Jun;47(6):849-854.
- (230) Mikuls TR, Hughes LB, Westfall AO, Holers VM, Parrish L, van der Heijde D, et al. Cigarette smoking, disease severity and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2008 Nov;67(11):1529-1534.
- (231) de Rooy DP, van Nies JA, Kapetanovic MC, Kristjansdottir H, Andersson ML, Forslind K, et al. Smoking as a risk factor for the radiological severity of rheumatoid arthritis: a study on six cohorts *Ann Rheum Dis* 2014 Jan 3.
- (232) Tuomi T, Heliovaara M, Palosuo T, Aho K. Smoking, lung function, and rheumatoid factors *Ann Rheum Dis* 1990 Oct;49(10):753-756.
- (233) Jonsson T, Thorsteinsson J, Valdimarsson H. Does smoking stimulate rheumatoid factor production in non-rheumatic individuals? *APMIS* 1998 Oct;106(10):970-974.
- (234) Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, 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* 2003 Sep;62(9):835-841.
- (235) Padyukov L, Silva 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* 2004 Oct;50(10):3085-3092.
- (236) Westwood OM, Nelson PN, Hay FC. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology (Oxford)* 2006 Apr;45(4):379-385.
- (237) Teitsson I, Withrington RH, Seifert MH, Valdimarsson H. Prospective study of early rheumatoid arthritis. I. Prognostic value of IgA rheumatoid factor *Ann Rheum Dis* 1984 Oct;43(5):673-678.
- (238) Houssien DA, Jonsson T, Davies E, Scott DL. Rheumatoid factor isotypes, disease activity and the outcome of rheumatoid arthritis: comparative effects of different antigens *Scand J Rheumatol* 1998;27(1):46-53.
- (239) Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease *Bioessays* 2003 Nov;25(11):1106-1118.
- (240) Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin *J Immunol* 2001 Mar 15;166(6):4177-4184.
- (241) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin *Arthritis Res Ther* 2004;6(2):R142-50.

- (242) Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells *Ann Rheum Dis* 2008 Oct;67(10):1488-1492.
- (243) Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review *Curr Rheumatol Rep* 2014 Mar;16(3):408-014-0408-9.
- (244) Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule *J Immunol* 2003 Jul 15;171(2):538-541.
- (245) Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins *Arthritis Rheum* 2005 Nov;52(11):3433-3438.
- (246) van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2006 Apr;54(4):1117-1121.
- (247) Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F, et al. Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides *J Immunol* 2005 Apr 15;174(8):5057-5064.
- (248) Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 2004;6(3):107-111.
- (249) van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis *J Immunol* 2005 Nov 1;175(9):5575-5580.
- (250) De Vries RRP, Huizinga TWJ, Toes REM. HLA and RA revisited: citrullinated food for the SE hypothesis, the DR6 effect, and NIMA. *Hum Immunol*. 2006 Jun;67(6):454-9.
- (251) de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. HLA and RA revisited: citrullinated food for the SE hypothesis, the DR6 effect, and NIMA *Hum Immunol* 2006 Jun;67(6):454-459.
- (252) van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2004 Jul;50(7):2113-2121.
- (253) Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL, el Bannoudi H, Elferink BG, Drijfhout JW, et al. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2010 Jan;62(1):117-125.
- (254) Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Feb 24;243(3):641-646.
- (255) Tsuji Y, Akiyama M, Arita K, Senshu T, Shimizu H. Changing pattern of deiminated proteins in developing human epidermis *J Invest Dermatol* 2003 May;120(5):817-822.
- (256) Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue *Arthritis Rheum* 2004 Nov;50(11):3485-3494.
- (257) Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination *Arthritis Rheum* 2006 Jan;54(1):38-46.
- (258) Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis *Annu Rev Immunol* 2008;26:651-675.

- (259) Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis *Semin Immunol* 2011 Apr;23(2):92-98.
- (260) Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells *Ann Rheum Dis* 2008 Oct;67(10):1488-1492.
- (261) Lee DM, Phillips R, Hagan EM, Chibnik LB, Costenbader KH, Schur PH. Quantifying anti-cyclic citrullinated peptide titres: clinical utility and association with tobacco exposure in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2009 Feb;68(2):201-208.
- (262) Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, 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* 2006 Mar;65(3):366-371.
- (263) Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, Madsen HO, Klarlund M, Svejgaard A, et al. Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark *Arthritis Rheum* 2007 May;56(5):1446-1453.
- (264) van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide *Arthritis Rheum* 2007 Feb;56(2):425-432.
- (265) Michou L, Teixeira VH, Pierlot C, Lasbleiz S, Bardin T, Dieude P, et al. Associations between genetic factors, tobacco smoking and autoantibodies in familial and sporadic rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2008 Apr;67(4):466-470.
- (266) Klareskog L, Alfredsson L, Rantapaa-Dahlqvist S, Berglin E, Stolt P, Padyukov L. What precedes development of rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004 Nov;63 Suppl 2:ii28-ii31.
- (267) Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis *J Periodontol* 2001 Jun;72(6):779-787.
- (268) Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis *Inflammation* 2004 Dec;28(6):311-318.
- (269) de Smit MJ, Brouwer E, Vissink A, van Winkelhoff AJ. Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination *Anaerobe* 2011 Aug;17(4):196-200.
- (270) Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, Mouglin B, Miossec P. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction *Ann Rheum Dis* 2006 Jul;65(7):905-909.
- (271) Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review *J Periodontol* 2005 Nov;76(11 Suppl):2066-2074.
- (272) de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population *J Rheumatol* 2008 Jan;35(1):70-76.
- (273) Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, Thiele GM, Maziarz E, Cannella AC, et al. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis *Int Immunopharmacol* 2009 Jan;9(1):38-42.
- (274) Mikuls TR. Help stop tooth decay...and prevent RA? *J Rheumatol* 2010 Jun;37(6):1083-1085.
- (275) Farquharson D, Butcher JP, Culshaw S. Periodontitis, *Porphyromonas*, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Mucosal Immunol* 2012 Mar;5(2):112-120.

- (276) Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(3):356-365.
- (277) Ramon J, Echeverria J. Effects of smoking on periodontal tissues *J Clin Periodontol* 2002;29(8):771-776.
- (278) Baumert Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwart KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy *J Clin Periodontol* 1994;21(2):91-97.
- (279) Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota *J Clin Periodontol* 2001;28(5):377-388.
- (280) Katz J, Goultshin J, Benoliel R, Brautbar C. Human leukocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressing periodontitis *J Periodontol* 1987 Sep;58(9):607-610.
- (281) Bonfil JJ, Dillier FL, Mercier P, Reviron D, Foti B, Sambuc R, 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* 1999 Feb;26(2):77-84.
- (282) Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection *Nat Rev Rheumatol* 2010 Dec;6(12):727-730.
- (283) Janssen KM, Vissink A, de Smit MJ, Westra J, Brouwer E. Lessons to be learned from periodontitis *Curr Opin Rheumatol* 2013 Mar;25(2):241-247.
- (284) Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, et al. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2014 Jan;73(1):263-269.
- (285) Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to *porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives *J Rheumatol* 2010 Jun;37(6):1105-1112.
- (286) Morgan K, Clague RB, Reynolds I, Davis M. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol* 1993 Apr;32(4):333-335.
- (287) Cook AD, Rowley MJ, Mackay IR, Gough A, Emery P. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression *Arthritis Rheum* 1996 Oct;39(10):1720-1727.
- (288) Sekine T, Masuko-Hongo K, Matsui T, Asahara H, Takigawa M, Nishioka K, et al. Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2001 Jan;60(1):49-54.
- (289) Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease *Nat Immunol* 2001 Aug;2(8):746-753.
- (290) Schubert D, Schmidt M, Zaiss D, Jungblut PR, Kamradt T. Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA *Nat Immunol* 2002 May;3(5):411; author reply 412-3.
- (291) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies *J Clin Invest* 1998 Jan 1;101(1):273-281.
- (292) Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, Aarden L, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis *Ann Rheum Dis* 2005 Aug;64(8):1199-1204.
- (293) Bas S, Perneger TV, Kunzle E, Vischer TL. Comparative study of different enzyme immunoassays for measurement of IgM and IgA rheumatoid factors *Ann Rheum Dis* 2002 Jun;61(6):505-510.

- (294) Shmerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility *Am J Med* 1991 Nov;91(5):528-534.
- (295) Visser H, Gelinck LB, Kampfraath AH, Breedveld FC, Hazes JM. Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1996 Mar;55(3):157-161.
- (296) Fehr T, Bachmann MF, Bucher E, Kalinke U, Di Padova FE, Lang AB, et al. Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies *J Exp Med* 1997 May 19;185(10):1785-1792.
- (297) Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *J Clin Rheumatol* 2005 Jun;11(3 Suppl):S39-44.
- (298) Shmerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: An analysis of clinical utility *Am J Med* 1991;91(5):528-534.
- (299) Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors *Rheumatology (Oxford)* 2002 Jul;41(7):809-814.
- (300) SHARIF S, EGHBAL S, GHARIBDOOST F, Kbarian MA, SHAHRAM F, NADJI A, et al. Comparative study of anti-CCP and RF for the diagnosis of rheumatoid arthritis *APLAR Journal of Rheumatology* 2007;10(2):121-124.
- (301) Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T, Girard P, Bouvier M, Lejeune E, et al. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1987 Jan;46(1):65-71.
- (302) Bonagura VR, Wedgwood JF, Agostino N, Hatam L, Mendez L, Jaffe I, et al. Seronegative rheumatoid arthritis, rheumatoid factor cross reactive idiotype expression, and hidden rheumatoid factors *Ann Rheum Dis* 1989 Jun;48(6):488-495.
- (303) Eberhardt KB, Truedsson L, Pettersson H, Svensson B, Stigsson L, Eberhardt JL, et al. Disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis: relation to IgG, IgA, and IgM rheumatoid factor *Ann Rheum Dis* 1990 Nov;49(11):906-909.
- (304) van Leeuwen MA, Westra J, van Riel PL, Limburg PC, van Rijswijk MH. IgM, IgA, and IgG rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis predictive of radiological progression? *Scand J Rheumatol* 1995;24(3):146-153.
- (305) Lutteri L, Malaise M, Chapelle JP. Comparison of second- and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies assays for detecting rheumatoid arthritis *Clin Chim Acta* 2007 Nov-Dec;386(1-2):76-81.
- (306) Thelier N, Assous N, Job-Deslandre C, Meyer O, Bardin T, Orcel P, et al. Osteoarticular involvement in a series of 100 patients with sarcoidosis referred to rheumatology departments *J Rheumatol* 2008 Aug;35(8):1622-1628.
- (307) Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2003 May;62(5):427-430.
- (308) Halldorsdottir HD, Jonsson T, Thorsteinsson J, Valdimarsson H. A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor *Ann Rheum Dis* 2000 Feb;59(2):149-151.
- (309) Nielsen SF, Bojesen SE, Schnohr P, Nordestgaard BG. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study *BMJ* 2012 Sep 6;345:e5244.

- (310) Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors *Arthritis Rheum* 2004 Feb;50(2):380-386.
- (311) Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005 Feb;19(1):55-72.
- (312) Juby AG, Davis P, McElhaney JE, Gravenstein S. Prevalence of selected autoantibodies in different elderly subpopulations *Br J Rheumatol* 1994 Dec;33(12):1121-1124.
- (313) Masi AT, Maldonado-Cocco JA, Kaplan SB, Feigenbaum SL, Chandler RW. Prospective study of the early course of rheumatoid arthritis in young adults: comparison of patients with and without rheumatoid factor positivity at entry and identification of variables correlating with outcome *Semin Arthritis Rheum* 1976 May;4(4):299-326.
- (314) Alarcon GS, Koopman WJ, Acton RT, Barger BO. Seronegative rheumatoid arthritis. A distinct immunogenetic disease? *Arthritis Rheum* 1982 May;25(5):502-507.
- (315) Westedt ML, Herbrink P, Molenaar JL, de Vries E, Verlaan P, Stijnen T, et al. Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis and vasculitis *Rheumatol Int* 1985;5(5):209-214.
- (316) Erhardt CC, Mumford PA, Venables PJ, Maini RN. Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study *Ann Rheum Dis* 1989 Jan;48(1):7-13.
- (317) Listing J, Rau R, Muller B, Alten R, Gromnica-Ihle E, Hagemann D, et al. HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor, and elevated C-reactive protein: independent risk factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Berlin Collaborating Rheumatological Study Group *J Rheumatol* 2000 Sep;27(9):2100-2109.
- (318) Combe B, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Eliaou JF, Sibilia J, et al. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study *Arthritis Rheum* 2001 Aug;44(8):1736-1743.
- (319) van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort EA, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study *Ann Rheum Dis* 1992 Sep;51(9):1029-1035.
- (320) NIENHUIS RL, MANDEMA E. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor *Ann Rheum Dis* 1964 Jul;23:302-305.
- (321) Janssens X, Veys EM, Verbruggen G, Declercq L. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1988 Sep;15(9):1346-1350.
- (322) Vivino FB, Maul GG. Histologic and electron microscopic characterization of the antiperinuclear factor antigen *Arthritis Rheum* 1990 Jul;33(7):960-969.
- (323) van Venrooij WJ, van Beers JJ, Pruijn GJ. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future *Nat Rev Rheumatol* 2011 Jun 7;7(7):391-398.
- (324) Westgeest AA, Boerbooms AM, Jongmans M, Vandenbroucke JP, Vierwinden G, van de Putte LB. Antiperinuclear factor: indicator of more severe disease in seronegative rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1987 Oct;14(5):893-897.
- (325) Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis *Br Med J* 1979 Jul 14;2(6182):97-99.
- (326) Hoet RM, Boerbooms AM, Arends M, Ruiter DJ, van Venrooij WJ. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin *Ann Rheum Dis* 1991 Sep;50(9):611-618.

- (327) Gomes-Daudrix V, Sebbag M, Girbal E, Vincent C, Simon M, Rakotoarivony J, et al. Immunoblotting detection of so-called 'antikeratin antibodies': a new assay for the diagnosis of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 1994 Nov;53(11):735-742.
- (328) Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies *J Clin Invest* 1995 Jun;95(6):2672-2679.
- (329) Palosuo T, Lukka M, Alenius H, Kalkkinen N, Aho K, Kurki P, et al. Purification of filaggrin from human epidermis and measurement of antifilaggrin autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis by an enzyme-linked immunosorbent assay *Int Arch Allergy Immunol* 1998 Apr;115(4):294-302.
- (330) Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues *J Immunol* 1999 Jan 1;162(1):585-594.
- (331) Vincent C, Simon M, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Cantagrel A, et al. Immunoblotting detection of autoantibodies to human epidermis filaggrin: a new diagnostic test for rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1998 May;25(5):838-846.
- (332) Nogueira L, Sebbag M, Vincent C, Arnaud M, Fournie B, Cantagrel A, et al. Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2001 Sep;60(9):882-887.
- (333) Slack SL, Mannik M, Dale BA. Diagnostic value of antibodies to filaggrin in rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1998 May;25(5):847-851.
- (334) Vincent C, Nogueira L, Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Arnaud M, Letourneur O, et al. Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2002 Aug;46(8):2051-2058.
- (335) van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value *Arthritis Res* 2002;4(2):87-93.
- (336) Palosuo T, Lukka M, Alenius H, Kalkkinen N, Aho K, Kurki P, et al. Purification of filaggrin from human epidermis and measurement of antifilaggrin autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis by an enzyme-linked immunosorbent assay *Int Arch Allergy Immunol* 1998 Apr;115(4):294-302.
- (337) Paimela L, Palosuo T, Aho K, Lukka M, Kurki P, Leirisalo-Repo M, et al. Association of autoantibodies to filaggrin with an active disease in early rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2001 Jan;60(1):32-35.
- (338) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies *J Clin Invest* 1998 Jan 1;101(1):273-281.
- (339) Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide *Arthritis Rheum* 2000 Jan;43(1):155-163.
- (340) Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review *Biomed Pharmacother* 2006 Dec;60(10):648-655.
- (341) van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis *Neth J Med* 2002 Nov;60(10):383-388.
- (342) dos Anjos LM, Pereira IA, d'Orsi E, Seaman AP, Burlingame RW, Morato EF. 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* 2009 Feb;28(2):153-158.

- (343) Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis *Clin Chem* 2001 Jun;47(6):1089-1093.
- (344) Jansen AL, van der Horst-Bruinsma I, van Schaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning MH, Dijkmans BA. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated Peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis *J Rheumatol* 2002 Oct;29(10):2074-2076.
- (345) Bas S, Genevay S, Meyer O, Gabay C. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2003 May;42(5):677-680.
- (346) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, et al. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis *Scand J Rheumatol* 2003;32(4):197-204.
- (347) Zeng X, Ai M, Tian X, Gan X, Shi Y, Song Q, et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated Peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 2003 Jul;30(7):1451-1455.
- (348) Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases *Ann Rheum Dis* 2003 Sep;62(9):870-874.
- (349) Van Venrooij WJ, van de Putte LBA, van den Hoogen FHJ. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in early rheumatoid arthritis: comment on the editorial by Scott. *Arthritis Rheum.* 2003 Mar;48(3):857; author reply 857-8.
- (350) Girelli F, Foschi FG, Bedeschi E, Calderoni V, Stefanini GF, Martinelli MG. Is Anti Cyclic citrullinated peptide a useful laboratory test for the diagnosis of rheumatoid arthritis? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2004 Apr;36(4):127-130.
- (351) Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis *Arthritis Research & Therapy* 2010;12(1):203.
- (352) Shibata S, Tada Y, Komine M, Hattori N, Osame S, Kanda N, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IL-23p19 in psoriatic arthritis *J Dermatol Sci* 2009 Jan;53(1):34-39.
- (353) Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjogren syndrome may be associated with non-erosive synovitis *Arthritis Res Ther* 2008;10(3):R51.
- (354) Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, Cohen-Solal J, Aucouturier F, Goetz J, et al. Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome *Ann Rheum Dis* 2005 Jan;64(1):114-117.
- (355) Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Lama N, Bonacci E, Bobbio-Pallavicini F, Montecucco C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in primary Sjogren syndrome may be associated with non-erosive synovitis *Arthritis Res Ther* 2008;10(3):R51.
- (356) Mohammed K, Pope J, Le Riche N, Brintnell W, Cairns E, Coles R, et al. Association of severe inflammatory polyarthritis in primary Sjogren's syndrome: clinical, serologic, and HLA analysis *J Rheumatol* 2009 Sep;36(9):1937-1942.
- (357) Qing YF, Zhang QB, Zhou JG, Yuan GH, Wei J, Xing Y, et al. The detecting and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with systemic lupus erythematosus *Lupus* 2009 Jul;18(8):713-717.
- (358) Chan MT, Owen P, Dunphy J, Cox B, Carmichael C, Korendowych E, et al. Associations of erosive arthritis with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and MHC Class II alleles in systemic lupus erythematosus *J Rheumatol* 2008 Jan;35(1):77-83.

- (359) Kakumanu P, Sobel ES, Narain S, Li Y, Akaogi J, Yamasaki Y, et al. Citrulline dependence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in systemic lupus erythematosus as a marker of deforming/erosive arthritis *J Rheumatol* 2009 Dec;36(12):2682-2690.
- (360) Mediawake R, Isenberg DA, Schellekens GA, van Venrooij WJ. Use of anti-citrullinated peptide and anti-RA33 antibodies in distinguishing erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2001 Jan;60(1):67-68.
- (361) Bogliolo L, Alpini C, Caporali R, Scire CA, Moratti R, Montecucco C. Antibodies to cyclic citrullinated peptides in psoriatic arthritis *J Rheumatol* 2005 Mar;32(3):511-515.
- (362) Popescu C, Zofota S, Bojinca V, Ionescu R. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis--cross-sectional study and literature review *J Med Life* 2013 Dec 15;6(4):376-382.
- (363) Olivieri I, Palazzi C, Padula A. Hepatitis C virus and arthritis *Rheum Dis Clin North Am* 2003 Feb;29(1):111-122.
- (364) Zuckerman E, Yeshurun D, Rosner I. Management of hepatitis C virus-related arthritis *BioDrugs* 2001;15(9):573-584.
- (365) Newkirk MM. Rheumatoid factors: what do they tell us? *J Rheumatol* 2002 Oct;29(10):2034-2040.
- (366) Leone N, Pellicano R, Ariata Maiocco I, Modena V, Marietti G, Rizzetto M, et al. Mixed cryoglobulinaemia and chronic hepatitis C virus infection: the rheumatic manifestations *J Med Virol* 2002 Feb;66(2):200-203.
- (367) Wener MH, Hutchinson K, Morishima C, Gretch DR. Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia *Arthritis Rheum* 2004 Jul;50(7):2305-2308.
- (368) 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* 2006 Jul;65(7):845-851.
- (369) Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd- and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins *Clin Chem* 2007 Aug;53(8):1527-1533.
- (370) Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2009 Nov 15;61(11):1472-1483.
- (371) Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2003 Oct;48(10):2741-2749.
- (372) van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study *Arthritis Rheum* 2004 Mar;50(3):709-715.
- (373) 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* 2006 Jul;65(7):845-851.
- (374) Li H, Song W, Li Y, Liu Y, Bai J, Li X, et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in northern Chinese Han patients with rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity *Clin Rheumatol* 2010 Apr;29(4):413-417.
- (375) Li H, Song W, Li Y, Liu Y, Bai J, Li X, et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in northern Chinese Han patients with rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity. *Clin Rheumatol*. 2010 Apr;29(4):413-7.

- (376) Salvador G, Gomez A, Vinas O, Ercilla G, Canete JD, Munoz-Gomez J, et al. Prevalence and clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide and antikeratin antibodies in palindromic rheumatism. An abortive form of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 2003 Aug;42(8):972-975.
- (377) Infantino M, Manfredi M, Meacci F, Sarzi-Puttini P, Ricci C, Atzeni F, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor isotypes in the diagnosis of rheumatoid arthritis: an assessment of combined tests *Clinica Chimica Acta* 2014;436:237-242.
- (378) Forslind K, Ahlmen M, Eberhardt K, Hafstrom I, Svensson B, BARFOT Study Group. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP) *Ann Rheum Dis* 2004 Sep;63(9):1090-1095.
- (379) Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2003 May;62(5):427-430.
- (380) Hughes RG, Surmacz, MJ, Karim AR, Bradwell AR. Atlas of tissue autoantibodies. Third Edition 2008. Published by The Binding Site Ltd.
- (381) Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis *Arthritis Rheum* 2002 Feb;46(2):357-365.
- (382) Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, Odegard S, Haavardsholm EA, Mowinckel P, et al. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study *Ann Rheum Dis* 2008 Feb;67(2):212-217.
- (383) Ursum J, Bos WH, van Dillen N, Dijkmans BA, van Schaardenburg D. Levels of anti-citrullinated protein antibodies and IgM rheumatoid factor are not associated with outcome in early arthritis patients: a cohort study *Arthritis Res Ther* 2010;12(1):R8.
- (384) Laki J, Lundstrom E, Snir O, Ronnelid J, Ganji I, Catrina AI, et al. Very high levels of anti-citrullinated protein antibodies are associated with HLA-DRB1*15 non-shared epitope allele in patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2012 Jul;64(7):2078-2084.
- (385) Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project) *Ann Rheum Dis* 2004 Sep;63(9):1085-1089.
- (386) Ronnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, et al. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression *Ann Rheum Dis* 2005 Dec;64(12):1744-1749.
- (387) Sanmarti R, Graell E, Perez ML, Ercilla G, Vinas O, Gomez-Puerta JA, et al. Diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric fibrin/filaggrin citrullinated synthetic peptides in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 2009;11(5):R135.
- (388) Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Bugatti S, Montecucco C. What can we learn from treatment-induced changes in rheumatoid factor and anti-citrullinated Peptide antibodies? *J Rheumatol* 2008 Oct;35(10):1903-1905.
- (389) Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment *Arthritis Res Ther* 2004;6(3):R264-72.
- (390) Vis M, Bos WH, Wolbink G, Voskuyl AE, Twisk JW, Van de Stadt R, et al. IgM-rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide, and anti-citrullinated human fibrinogen antibodies decrease during treatment with the tumor necrosis factor blocker infliximab in patients with rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 2008 Mar;35(3):425-428.

- (391) Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, Cinquini M, Magrini L, Tincani A, et al. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement *Ann Rheum Dis* 2004 Oct;63(10):1218-1221.
- (392) Caramaschi P, Biasi D, Tonolli E, Pieropan S, Martinelli N, Carletto A, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients affected by rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment *Rheumatol Int* 2005 Nov;26(1):58-62.
- (393) De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IE, Veys EM, et al. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2005 Feb;64(2):299-302.
- (394) Chen HA, Lin KC, Chen CH, Liao HT, Wang HP, Chang HN, et al. The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2006 Jan;65(1):35-39.
- (395) Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Dell'Acqua D, de Portu S, Cecchini G, Cruini C, et al. Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study *Arthritis Res Ther* 2006;8(1):R3.
- (396) Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, Cinquini M, Magrini L, Tincani A, et al. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement *Ann Rheum Dis* 2004 Oct;63(10):1218-1221.
- (397) Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avasse S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment *Arthritis Res Ther* 2004;6(3):R264-72.
- (398) De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IE, Veys EM, et al. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2005 Feb;64(2):299-302.
- (399) Kolarz B, Majdan M, Dryglewska M, Darmochwal-Kolarz D. Antibodies against cyclic citrullinated peptide don't decrease after 6 months of infliximab treatment in refractory rheumatoid arthritis *Rheumatol Int* 2011 Nov;31(11):1439-1443.
- (400) Bohler C, Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Serological changes in the course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2013 Feb;72(2):241-244.
- (401) Bos WH, Bartelds GM, Wolbink GJ, de Koning MH, van de Stadt RJ, van Schaardenburg D, et al. Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 2008 Oct;35(10):1972-1977.
- (402) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin *Arthritis Res Ther* 2004;6(2):R142-50.
- (403) Hayem G, Chazerain P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P, et al. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 1999 Jan;26(1):7-13.
- (404) Escalona M, Lopez-Longo FJ, Gonzalez CM, Monteagudo I, Rodriguez-Mahou M, Grau R, et al. Anti-Sa sera from patients with rheumatoid arthritis contain at least 2 different subpopulations of anti-Sa antibodies *J Rheumatol* 2002 Oct;29(10):2053-2060.
- (405) Hueber W, Hassfeld W, Smolen JS, Steiner G. Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 1999 Feb;38(2):155-159.
- (406) Van Steendam K, Tilleman K, Deforce D. The relevance of citrullinated vimentin in the production of antibodies against citrullinated proteins and the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 2011 May;50(5):830-837.
- (407) Lopez-Longo FJ, Rodriguez-Mahou M, Sanchez-Ramon S, Estechea A, Balsera M, Plaza R, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide versus anti-Sa antibodies in diagnosis of rheumatoid arthritis in an

outpatient clinic for connective tissue disease and spondyloarthritis *J Rheumatol* 2006 Aug;33(8):1476-1481.

(408) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin *Arthritis Res Ther* 2004;6(2):R142-50.

(409) Bang H, Egerer K, Gauliard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2007 Aug;56(8):2503-2511.

(410) Bang H, Egerer K, Gauliard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2007 Aug;56(8):2503-2511.

(411) Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Alkaabi J. Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies, anti-cyclic citrullinated Peptide antibodies and rheumatoid factor in omani patients with rheumatoid arthritis *Int J Rheumatol* 2012;2012:285854.

(412) Luime JJ, Colin EM, Hazes JM, Lubberts E. Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review *Ann Rheum Dis* 2010 Feb;69(2):337-344.

(413) Syversen SW, Goll GL, van der Heijde D, Landewe R, Lie BA, Odegard S, et al. Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study *Ann Rheum Dis* 2010 Feb;69(2):345-351.

(414) Avdeeva AS, Aleksandrova EN, Novikov AA, Smirnov AV, Cherkasova MV, Nasonov EL. The relationship of antibodies to modified citrullinated vimentin and markers of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis *Int J Rheumatol* 2014;2014:464585.

(415) Hassfeld W, Steiner G, Studnicka-Benke A, Skriner K, Graninger W, Fischer I, et al. Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1995 Jun;38(6):777-785.

(416) Isenberg DA, Steiner G, Smolen JS. Clinical utility and serological connections of anti-RA33 antibodies in systemic lupus erythematosus *J Rheumatol* 1994 Jul;21(7):1260-1263.

(417) Hassfeld W, Steiner G, Graninger W, Witzmann G, Schweitzer H, Smolen JS. Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol* 1993 Mar;32(3):199-203.

(418) Combe B, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Eliaou JF, Sibilia J, et al. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study *Arthritis Rheum* 2001 Aug;44(8):1736-1743.

(419) Mustila A, Paimela L, Leirisalo-Repo M, Huhtala H, Miettinen A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with early rheumatoid arthritis: an early marker of progressive erosive disease *Arthritis Rheum* 2000 Jun;43(6):1371-1377.

(420) Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, Fardellone P, Lange C, Marvin L, et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2002 May;46(5):1196-1201.

(421) Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease *Nat Immunol* 2001 Aug;2(8):746-753.

(422) Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, et al. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders *Arthritis Rheum* 2003 Apr;48(4):944-954.

(423) van Gaalen FA, Toes RE, Ditzel HJ, Schaller M, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2004 Feb;50(2):395-399.

- (424) Mahdi H, Fisher BA, Kallberg H, Plant D, Malmstrom V, Ronnelid J, et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis *Nat Genet* 2009 Dec;41(12):1319-1324.
- (425) Seriola B, Fasciolo D, Sulli A, Cutolo M. Homocysteine and antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis patients: relationships with thrombotic events *Clin Exp Rheumatol* 2001 Sep-Oct;19(5):561-564.
- (426) Gladd DA, Olech E. Antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis: identifying the dominoes *Curr Rheumatol Rep* 2009 Feb;11(1):43-51.
- (427) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1982 Nov;25(11):1271-1277.
- (428) Petri M. Review of classification criteria for systemic lupus erythematosus *Rheum Dis Clin North Am* 2005 May;31(2):245-54, vi.
- (429) Alarcon-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients *J Rheumatol* 1989 Mar;16(3):328-334.
- (430) van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria *Arthritis Rheum* 1984 Apr;27(4):361-368.
- (431) Kammer GM, Soter NA, Gibson DJ, Schur PH. Psoriatic arthritis: a clinical, immunologic and HLA study of 100 patients *Semin Arthritis Rheum* 1979 Nov;9(2):75-97.
- (432) Altman RD. Criteria for classification of clinical osteoarthritis *J Rheumatol Suppl* 1991 Feb;27:10-12.
- (433) Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association *Arthritis Rheum* 1986 Aug;29(8):1039-1049.
- (434) Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand *Arthritis Rheum* 1990 Nov;33(11):1601-1610.
- (435) Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yu TF. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout *Arthritis Rheum* 1977 Apr;20(3):895-900.
- (436) Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1995 Jan;38(1):44-48.
- (437) van Riel PLCM. Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 2000;59(90001):28-31.
- (438) Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VP, Stamm T, Smolen JS. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states *Arthritis Rheum* 2005 Sep;52(9):2625-2636.
- (439) Vander Cruyssen B, Van Looy S, Wyns B, Westhovens R, Durez P, Van den Bosch F, et al. DAS28 best reflects the physician's clinical judgment of response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients: validation of the DAS28 score in patients under infliximab treatment *Arthritis Res Ther* 2005;7(5):R1063-71.
- (440) Smolen JS, Han C, Bala M, Maini RN, Kalden JR, van der Heijde D, et al. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study *Arthritis Rheum* 2005 Apr;52(4):1020-1030.

- (441) Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Kavanaugh AF, Chartash EK, Segurado OG. Long term efficacy and safety of adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4 year extended study *Ann Rheum Dis* 2006 Jun;65(6):753-759.
- (442) Inoue E, Yamanaka H, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values *Ann Rheum Dis* 2007 Mar;66(3):407-409.
- (443) Castrejon I, Ortiz AM, Garcia-Vicuna R, Lopez-Bote JP, Humbria A, Carmona L, et al. Are the C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rate equivalent when estimating the 28-joint disease activity score in rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol* 2008 Sep-Oct;26(5):769-775.
- (444) DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach *Biometrics* 1988 Sep;44(3):837-845.
- (445) Willkens RF, Nepom GT, Marks CR, Nettles JW, Nepom BS. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis *Arthritis Rheum* 1991 Jan;34(1):43-47.
- (446) Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis *Ann Intern Med* 2007 Jun 5;146(11):797-808.
- (447) Sociedad Española de Reumatología. Actualización de la Guía de Práctica Clínica para el manejo de la AR en España. España: Sociedad Española de Reumatología; 2011.
- (448) Dawidowicz K, Allanore Y, Guedj M, Pierlot C, Bombardieri S, Balsa A, et al. The interferon regulatory factor 5 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis and influences its erosive phenotype. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):117-21.
- (449) Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FAS, Liljedahl U, Wiman A-C, Alfredsson L, et al. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jul;56(7):2202-10.
- (450) Blanco FJ, Ballina J, Carbonell J, Martín-Mola E, Tornero J, Ramírez E, et al. [Descriptive study of the use of DMARD in patients with rheumatoid arthritis or persistent arthritis who start drug treatment in Spain (FIRST)]. *Reumatol Clin*. Elsevier; 2011 Jan 1;7(2):88-93.
- (451) Villaverde García V, Balsa A, Carmona L, Sanmartí R, Maese J, Pascual D, et al. [What are patients with early rheumatoid arthritis like in Spain? Description of the PROAR cohort]. *Reumatol Clin*. 2009 Jan;5(3):115-20.
- (452) Lajas C, Abasolo L, Bellajdel B, Hernández-García C, Carmona L, Vargas E, et al. Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study. *Arthritis Rheum*. 2003 Feb 15;49(1):64-70.
- (453) Balsa A, Gijón J, Pascual-Salcedo D, Tinturé T, Victoria Irigoyen M, Rodríguez-Lozano C, et al. Características clínicas de la artritis familiar en España. Estudio de 73 familias. *Med Clin (Barc)*. 2000 Jan;114(1):3-6.
- (454) Castañeda S, Navarro F, Fernández-Carballido C, Tornero C, Marced E, Corteguera M. [Differences in the management of early and established rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin*. 2011 Jan;7(3):172-8.
- (455) Maese J, García De Yébenes MJ, Carmona L, Hernández-García C. Management of Rheumatoid Arthritis in Spain (emAR II). Clinical Characteristics of the Patients. *Reumatol Clínica*. 2012 Sep;8(5):236-42.
- (456) Sokka T, Kautiainen H, Toloza S, Mäkinen H, Verstappen SMM, Lund Hetland M, et al. QUEST-RA: quantitative clinical assessment of patients with rheumatoid arthritis seen in standard rheumatology care in 15 countries. *Ann Rheum Dis*. 2007 Nov;66(11):1491-6.
- (457) Low JM, Chauhan AK, Kietz DA, Daud U, Pepmueller PH, Moore TL. Determination of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2004 Sep;31(9):1829-33.

- (458) Sockalingam S, Khuan CS, Sthaneshwar P. Prevalence of anti cyclic citrullinated peptide antibodies in Malaysian rheumatoid arthritis patients and its correlation with disease activity. *Int J Rheum Dis*. 2009 Sep;12(3):211–5.
- (459) Payet J, Goulvestre C, Bialé L, Avouac J, Wipff J, Job-Deslandre C, et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid and nonrheumatoid rheumatic disorders: experience with 1162 patients. *J Rheumatol*. 2014 Dec;41(12):2395–402.
- (460) Van der Heijde DM, van Riel PL, van Leeuwen MA, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. Older versus younger onset rheumatoid arthritis: results at onset and after 2 years of a prospective followup study of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1991 Sep;18(9):1285–9.
- (461) El-Labban AS, Omar HASA, El-Shereif RR, Ali F, El-Mansoury TM. Pattern of Young and Old Onset Rheumatoid Arthritis (YORA and EORA) Among a Group of Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2010 Jan;3:25–31.
- (462) Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum*. 2002 Aug;47(4):434–44.
- (463) Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, Piñeiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloy JA, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Feb 15;57(1):125–32.
- (464) Balsa A, Minaur NJ, Pascual-Salcedo D, McCabe C, Balas A, Fiddament B, et al. Class II MHC antigens in early rheumatoid arthritis in Bath (UK) and Madrid (Spain). *Rheumatology (Oxford)* 2000 Aug;39(8):844–9.
- (465) McDonagh JE, Dunn A, Ollier WE, Walker DJ. Compound heterozygosity for the shared epitope and the risk and severity of rheumatoid arthritis in extended pedigrees. *Br J Rheumatol*. 1997 Mar;36(3):322–7.
- (466) Takasaki Y, Yamanaka K, Takasaki C, Matsushita M, Yamada H, Nawata M, et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with mixed connective tissue disease. *Mod Rheumatol*. 2004 Jan;14(5):367–75.
- (467) Caspi D, Anouk M, Golan I, Paran D, Kaufman I, Wigler I, et al. Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb 15;55(1):53–6.
- (468) Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2014 Jan;48-49:26–30.
- (469) Vittecoq O, Incauragarat B, Jouen-Beades F, Legoedec J, Letourneur O, Rolland D, et al. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jan;135(1):173–80.
- (470) Fernández-Suárez A, Reneses S, Wichmann I, Criado R, Núñez A. Efficacy of three ELISA measurements of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*. 2005 Jan;43(11):1234–9.
- (471) Raza K, Filer A. The therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis: does it ever close? *Ann Rheum Dis*. 2015 May;74(5):793–4.
- (472) Abdel-Nasser AM, Mahmoud MH, El Mansoury TM, Osman AM. Anti-CCP2 is an adjunct to, not a surrogate for, rheumatoid factor in the diagnosis of rheumatoid arthritis: diagnostic utility of anti-CCP2 antibodies in Egyptian patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2008 Jan;37(5):329–36.
- (472) Aggarwal A. Role of autoantibody testing. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Dec;28(6):907–20.
- (473) Vasiliauskiene L, Wiik A, Høier-Madsen M. Prevalence and clinical significance of antikeratin antibodies and other serological markers in Lithuanian patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2001 May;60(5):459–66.
- (474) Hill JA, Al-Bishri J, Gladman DD, Cairns E, Bell DA. Serum autoantibodies that bind citrullinated fibrinogen are frequently found in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2006 Nov;33(11):2115–9.

- (475) Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Lapadula G, Pansini N. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: Analytical performance and clinical correlations. *Clin Chim Acta*. 2005 May 355(1-2):137–44.
- (476) Herold M, Boeser V, Russe E, Klotz W. Anti-CCP: history and its usefulness. *Clin Dev Immunol*. 2005 Jun;12(2):131–5.
- (477) García-Berrocal B, González C, Pérez M, Navajo JA, Moreta I, Dávila C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in IgM rheumatoid factor-positive patients. *Clin Chim Acta*. 2005 Apr;354(1-2):123–30.
- (478) Grootenboer-Mignot S, Nicaise-Roland P, Delaunay C, Meyer O, Chollet-Martin S, Labarre C. Second generation anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) antibodies can replace other anti-filaggrin antibodies and improve rheumatoid arthritis diagnosis. *Scand J Rheumatol*. 2004 Jan;33(4):218–20.
- (479) Sun J, Zhang Y, Liu L, Liu G. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Jan;32(1):11–21.
- (480) Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jan;45(1):20–5.
- (481) De Rycke L, Peene I, Hoffman IEA, Kruihof E, Union A, Meheus L, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis*. 2004 Dec;63(12):1587–93.
- (482) Manivelavan D, C K V. Anti-cyclic citrullinated Peptide antibody: an early diagnostic and prognostic biomarker of rheumatoid arthritis. *J Clin Diagn Res*. 2012 Oct;6(8):1393–6.
- (483) Alexiou I, Germeis A, Ziogas A, Theodoridou K, Sakkas LI. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jan;8:37.
- (484) Chang P-Y, Yang C-T, Cheng C-H, Yu K-H. Diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2015 May 4.
- (485) Melguizo E, Navarro V, Hernández B, Santos K, Arrobas T, Domínguez C, et al. Diagnostic utility of oxidative damage markers for early rheumatoid arthritis in non-smokers and negative anti-CCP patients. *An Sist Sanit Navar*. 2014 Jan;37(1):109–15.
- (486) Deng X, Crowson CS, Rajkumar S V., Dispenzieri A, Larson DR, Thorneau TM, et al. Elevation of Serum Immunoglobulin Free Light Chains During the Preclinical Period of Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2015 Jan 15;42(2):181–7.
- (487) Ye Y, Li S-L, Xie M, Jiang P, Liu K-G, Li Y-J. Judging disease activity in rheumatoid arthritis by serum free kappa and lambda light chain levels. *Kaohsiung J Med Sci*. 2013 Oct;29(10):547–53.
- (488) Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2007 May;80(5):867–75.
- (489) Padyukov L, Seielstad M, Ong RTH, Ding B, Ronnelid J, Seddighzadeh M, et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Feb;70(2):259–65.
- (490) Too C, Yahya A, Murad S, Dhaliwal J, Larsson P, Muhamad N, et al. Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA). *Arthritis Res Ther*. 2012 Jan;14(2):R89.
- (491) Sköldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Mar;62(3):208–14.
- (492) Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005 Mar;4(3):130–6.

- (493) Verheul MK, Fearon U, Trouw LA, Veale DJ. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. *Clin Immunol*. 2015 Apr 28
- (494) Jutley G, Raza K, Buckley CD. New pathogenic insights into rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015 May;27(3):249–55.
- (495) Catrina AI, Deane KD, Scher JU. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Dec 23
- (496) Wagner CA, Sokolove J, Lahey LJ, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Alfredsson L, et al. Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 “shared epitope” alleles. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):579–86.
- (497) Lundberg K, Bengtsson C, Kharlamova N, Reed E, Jiang X, Kallberg H, 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*. 2013 May;72(5):652–8.
- (498) Kokkonen H, Brink M, Hansson M, Lassen E, Mathsson-Alm L, Holmdahl R, et al. Associations of antibodies against citrullinated peptides with human leukocyte antigen-shared epitope and smoking prior to the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther [Internet]*. 2015 Jan;17:125.
- (499) Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis*. 2003 Feb;62(2):120–6.
- (500) Van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FH, van Booma-Frankfort C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1999 Jan;17(6):689–97.
- (501) Nell VPK, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Dec;64(12):1731–6.
- (502) Van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005 Jan;7(5):R949–58.
- (503) Mouterde G, Lukas C, Goupille P, Flipo R-M, Rincheval N, Daurès J-P, et al. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies and/or rheumatoid factor status and clinical presentation in early arthritis: results from the ESPOIR cohort. *J Rheumatol*. 2014 Aug;41(8):1614–22.
- (504) Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes REM, 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*. 2015 Jan;17:25.
- (505) Boire G, Cossette P, de Brum-Fernandes AJ, Liang P, Niyonsenga T, Zhou ZJ, 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*. 2005 Jan;7(3):R592–603.
- (506) Hafström I, Engvall I-L, Rönnelid J, Boonen A, van der Heijde D, Svensson B. Rheumatoid factor and anti-CCP do not predict progressive joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with prednisolone: a randomised study. *BMJ Open*. 2014 Jan;4(7):e005246.
- (507) Vittecoq O. Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients. *Rheumatology*. 2003 Mar 14;42(8):939–46.
- (508) Kuru O, Bilgici A, Birinci A, Ulusoy H, Durupinar B. Prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Bratisl Lek Listy*. 2009 Jan;110(10):650–4.
- (509) Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, et al. Association of HLA-DRB1 Haplotypes With Rheumatoid Arthritis Severity, Mortality, and Treatment Response. *JAMA*. 2015 Apr 28;313(16):1645.
- (510) Möttönen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Ilonen J, Hannonen P. Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with “sawtooth” strategy. *Ann Rheum Dis*. 1998 Sep;57(9):533–9.

- (511) Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):36–45.
- (512) Wagner E, Skoumal M, Bayer PM, Klaushofer K. Antibody against mutated citrullinated vimentin: a new sensitive marker in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2009 Sep;29(11):1315–21.
- (513) Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmun Rev.* 2014 Nov;13(11):1114–20.
- (514) Atzeni F, Benucci M, Sallì S, Bongiovanni S, Boccassini L, Sarzi-Puttini P. Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2013 Mar;12(5):575–9.
- (515) Navarro-Compán V, Melguizo-Madrid E, Hernández-Cruz B, Santos-Rey K, Leyva-Prado C, González-Martín C, et al. Interaction between oxidative stress and smoking is associated with an increased risk of rheumatoid arthritis: a case-control study. *Rheumatology (Oxford).* 2013 Mar;52(3):487–93.

La Artritis Reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica, inflamatoria y crónica que afecta al 0,5-1% de la población. Se asocia a daño articular severo y provoca un grave sufrimiento a la persona que la padece, derivando en una discapacidad importante en fases evolucionadas de la enfermedad y con pérdida de la calidad de vida. El diagnóstico y tratamiento precoz de la enfermedad es fundamental porque reduce la actividad, la progresión y la mortalidad asociada a la enfermedad. Además, la identificación de marcadores pronósticos de la enfermedad nos ayudaría a modificar el curso de la enfermedad. Con ello se evita el deterioro casi inevitable de las articulaciones del enfermo y por lo tanto se conseguiría una mejora en su calidad de vida.

Los nuevos criterios de clasificación de Artritis Reumatoide del año 2010 (ACR/EULAR) introducen cambios importantes en la valoración clínica y dan mucha importancia a los hallazgos analíticos: marcadores serológicos (Factor Reumatoide y anti-CCP) y reactantes de fase aguda (PCR y VSG). Además, la enfermedad tiene un importante componente genético definido por el epitopo compartido HLA-DRB1 cuya presencia se asocia a formas más severas de la enfermedad.

