



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Anticuerpos frente a péptidos carbamilados en la artritis reumatoide: Papel en el reumatismo palindrómico, la enfermedad pulmonar intersticial y la respuesta terapéutica

Raúl Antonio Castellanos Moreira

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS CARBAMILADOS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

PAPEL EN EL REUMATISMO PALINDRÓMICO, LA ENFERMEDAD
PULMONAR INTERSTICIAL Y EN LA RESPUESTA TERAPÉUTICA

Presentada por:

RAUL ANTONIO CASTELLANOS MOREIRA

PARA OPTAR AL GRADO DOCTOR EN MEDICINA

Codirectores de la Tesis:

Raimon Sanmarti Sala

Isabel Haro Villar

Barcelona, enero de 2021

DEDICATORIA

A mi familia

De quien aprendí
a luchar por mis objetivos,
a aspirar a la excelencia,
a que el trabajo duro tiene su recompensa,
a ser honesto y ético en el día a día.
Son todos ustedes (mis padres, hermanos, tíos, primos y sobrinos) mi mayor
inspiración.

A Leticia

Por todos los consejos,
por tu incondicional cariño, comprensión e interés,
pero principalmente por tu apoyo inextinguible,
que nunca me dejo dar por vencido.

A Luar Teil

Por darme el impulso final
para terminar con este proyecto e iniciar el próximo...

AGRADECIMIENTOS

Hay tantas personas que me han ayudado, unos de forma directa y otros sin darse cuenta, a cumplir con esta meta, a las que me gustaría agradecer.

A Raimon Sanmarti, quien ha sido mi tutor y profesor durante esta etapa. He aprendido mucho de ti en este periodo. No solo de la medicina e investigación, pero también sobre la vida. Gracias por tu paciencia, apoyo, consejos y por la confianza que has depositado en mí. Te agradezco por motivarme a ser mejor y darme libertad para crecer.

A Isabel Haro por su gran ímpetu en el trabajo (tan metódico y meticuloso) y su disposición para ayudar.

A mis compañeros de la Unidad de Artritis por todo su apoyo para llevar a cabo esta tesis, además de compartir sus conocimientos y destrezas conmigo. En especial a Virginia, por siempre estar dispuesta a echar una mano, y a Juan, por todo su apoyo e ingeniosidad.

A todos los demás adjuntos de Reumatología del Hospital Clínic de Barcelona por todos sus consejos y apoyo durante estos años. Especialmente a Nuria Guañabens, por hacerme sentir cómodo y valorado, y a Helena (mi co-R) con quien comenzamos la travesía de la reumatología juntos compartiendo muchas experiencias desde entonces. Que suerte he tenido de tenerte como compañera.

A mis compañeros durante la residencia, Paulina, tan única y ocurrente. A Stanka, Bea, y Ana Belén por su dedicación y apoyo en esta tesis. En especial a Sebastián, mi compañero de mil batallas, gracias por todo tu empeño y disposición, pero sobre todo por tu amistad. Sebastián, sabes que este logro también es tuyo.

A todo el personal adherido que da soporte al servicio de Reumatología y quienes además siempre cuidan de mí. En especial a Cristina, Nuria, Marta, Lola, Anabel, Susana y a "las Finas".

A todo el personal de la unidad de síntesis y aplicaciones biomédicas de péptidos del CSIC.

A todos los miembros del comité de neumopatía intersticial de los servicios de neumología, radiología, inmunología, enfermedades autoinmunes sistémicas, anatomía patológica, con quienes compartimos la tarde los lunes para mejorar la atención de nuestros pacientes.

Mis amigos, "Nosaltres", llegamos desde diferentes puntos, con diferentes ideas, pero con fines comunes. Hemos crecido juntos y vuestra compañía ha hecho este un camino más fácil y divertido. Otros amigos como Dani, Francesc, Juan, Ana, Nacho, Adolf y otros tantos por ayudarme a comprender diferentes puntos de vista y por vuestros consejos.

A Jorge Alejandro Castellanos Paz y Sebastián Podlipnik Castillo por su dedicación y colaboración artística.

Quiero finalizar agradeciendo a los pacientes, de quienes aprendo mucho, por la confianza de compartir con nosotros y por su predisposición desinteresada para apoyar la investigación.

Para crear primero hay que creer...

Autor desconocido

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	4
LA ARTRITIS REUMATOIDE	4
1.1 <i>Epidemiología</i>	5
1.2 <i>Etiología</i>	5
1.3 <i>Etiopatogenia</i>	9
1.4 <i>Fases de la Enfermedad</i>	12
1.5 <i>Manifestaciones clínicas</i>	14
1.6 <i>Manejo y tratamiento</i>	18
REUMATISMO PALÍNDROMICO.....	23
2.1 <i>Epidemiología</i>	23
2.2 <i>Etiopatogenia</i>	24
2.3 <i>Manifestaciones Clínicas y Criterios Diagnósticos</i>	26
2.4 <i>Progresión a la artritis reumatoide y otras enfermedades</i>	27
2.5 <i>Tratamiento</i>	29
ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A LA ARTRITIS REUMATOIDE	29
3.1 <i>Epidemiología y factores de riesgo</i>	32
3.2 <i>Etiopatogenia</i>	32
3.3 <i>Clasificación</i>	34
3.4 <i>Similitud entre la NIU relacionada a la AR y la FPI</i>	35
3.5 <i>Manifestaciones clínicas, diagnóstico y cribado</i>	36
3.6 <i>Pronóstico</i>	38
ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CARBAMILADAS.....	40
4.1 <i>El proceso de carbamilación</i>	41
4.2 <i>Efectos fisiopatológicos de la carbamilación</i>	42
4.3 <i>Carbamilación en el envejecimiento y enfermedades</i>	44
4.4 <i>Anti-CarP en la artritis reumatoide</i>	47
4.5 <i>Anti-CarP en las fases preclínicas de la artritis reumatoide</i>	51
4.6 <i>Anti-CarP y otras enfermedades reumatológicas</i>	52
4.7 <i>La familia AMPA</i>	53
HIPÓTESIS	58
OBJETIVOS	60

OBJETIVOS GENÉRICOS	60
OBJETIVOS CONCRETOS	60
INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS	62
PRIMER TRABAJO	63
<i>Resumen del primer trabajo</i>	74
SEGUNDO TRABAJO	76
<i>Resumen del segundo trabajo</i>	85
TERCER TRABAJO	87
<i>Resumen del tercer trabajo</i>	101
CUARTO TRABAJO	103
<i>Resumen del cuarto trabajo</i>	106
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES	125
REFERENCIAS	127
ADENDA	145

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABA	Abatacept
ACPA	Anticuerpos contra péptidos/ proteínas citrulinadas
ACR	Colegio americano de reumatología
AMPA	Anticuerpos contra proteínas modificadas
Anti-APA	Anticuerpos contra proteínas acetiladas
anti-CarP	Anticuerpos contra proteínas carbamiladas
AR	Artritis reumatoide
DLCO	Capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono
ECV	Enfermedad cardiovascular
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
EPI-AR	Enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoide
EULAR	Liga Europea Contra el Reumatismo
FAME	Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FR	Factor reumatoide
LDH	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MTX	Metotrexato
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
NIU	Neumonía intersticial usual
PFR	Pruebas de función pulmonar
PTM	Modificaciones postraduccionales
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 22

RP	Reumatismo palindrómico
SER	Sociedad Española de Reumatología
TACAR	Tomografía computarizada de alta resolución
VN	Valor normal

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LA ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica de naturaleza autoinmune, crónica caracterizada por inflamación de predominio articular y la presencia de autoanticuerpos, como el factor reumatoide (FR), y anticuerpos contra péptidos/ proteínas citrulinadas (ACPA). En caso de no ser tratada, la AR puede conducir a un daño articular y una discapacidad irreversible con deterioro importante de la calidad de vida. Esta enfermedad, también tiene un alto impacto económico para la sociedad debido a las pérdidas de productividad laboral y los costos directos e indirectos de la propia enfermedad o sus complicaciones.

La AR es un síndrome heterogéneo, con presentación clínica variable y probablemente con diferentes mecanismos patogénicos involucrados entre individuos con el mismo diagnóstico o según la etapa de la enfermedad. De hecho, aunque los autoanticuerpos son una característica importante de la AR, pueden estar ausentes en alrededor de un 30% de individuos con esta enfermedad. La presencia de factores ambientales (por ejemplo, el tabaquismo) incrementaría el riesgo de desarrollar la enfermedad en sujetos predispuestos genéticamente (portadores de determinados alelos HLA-DRB*).

En las últimas décadas, hemos sido testigos de una revolución en los conocimientos de esta patología, que ha sido impulsado principalmente por una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatológicos involucrados. Esto ha conducido al desarrollo de tratamientos dirigidos, reconocimiento temprano de la enfermedad, así como, a estrategias de tratamiento (guiada por objetivos) y al uso de fármacos que son capaces de cambiar de forma notable el curso natural de la enfermedad y evitar la destrucción y deformidades articulares.

Aunque la AR es un problema de salud considerable, todavía se conoce relativamente poco sobre su inmunopatología. Para el desarrollo de un enfoque de medicina personalizada, es esencial profundizar más en la comprensión de los mecanismos inmunológicos subyacentes a la AR.

1.1 Epidemiología

La prevalencia de la AR en la población adulta se estima alrededor del 0.5-1% (1, 2). En 2002 la Sociedad Española de Reumatología (SER), llevo a cabo un estudio en la población española adulta a nivel nacional, en el cual encontraron una prevalencia del 0.5% (IC 95%: 0.25 a 0.85). En las mujeres la prevalencia alcanzó el 0.8% (IC 95% 0.4-1.1) mientras en los hombres fue de 0.2% (IC 95%: <0.5). Extrapolando a la población total del país (alrededor de 47 millones), se estiman cerca de 200,000 casos de AR en España (3).

1.2 Etiología

Se han descrito varios factores de riesgo involucrados en el desarrollo de la AR, incluidos factores genéticos, el sexo femenino y los factores ambientales.

Los factores de riesgo ambientales propuestos incluyen tabaquismo, exposición a sílice, agentes infecciosos, deficiencia de vitamina D, obesidad y cambios en la microbiota, entre otros.

GENÉTICA

Existe un importante componente genético en esta enfermedad. Estudios de gemelos estiman que la heredabilidad (la proporción de la variación fenotípica que se debe a la variación genética en una población) de la AR es de ~ 60% (4). Esto se refiere sobre todo a pacientes con AR que son positivos para los ACPA.

Los gemelos idénticos muestran una concordancia de la enfermedad de solo un 12-15%, lo que indica que los factores no codificantes juegan un papel importante en la susceptibilidad (5) .

La genética de la AR es extraordinariamente compleja y a pesar de las muchas investigaciones al respecto, el sistema HLA sigue siendo a través del locus DRB1 el que confiere mayor susceptibilidad a la enfermedad. El epítipo compartido es un patrón de aminoácidos específico codificado comúnmente por algunos alelos del locus HLA DR, especialmente HLA-DRB1 * 01 y HLA-DRB1 * 04, que están muy asociados con el riesgo de desarrollar AR (6).

A través de estudios de asociación de todo el genoma con mapeo fino en grandes poblaciones, se han identificado alrededor de 100 loci que albergan variantes de susceptibilidad a la AR (7). Muchos de estos alelos se asocian solo débilmente y probablemente interactúan con otros genes y el medio ambiente (8). Además, se han observado modestos efectos acumulativos cuando hay varios alelos de riesgo (9).

También existe la variabilidad de susceptibilidad genética entre diferentes etnias. Por ejemplo, las mutaciones en el gen de la proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 22 (PTPN22) pueden incrementar el riesgo de AR en un 84% en etnias no asiáticas (10).

Comprender la regulación génica es crucial para definir qué genes son importantes en qué tipos de células para la predisposición a la AR, lo que, a su vez, contribuirá a la identificación de vías clave que conducen la enfermedad y permitirá la estratificación de la población con AR en grupos basados según dichas vías génicas.

SEXO

La AR predomina en las mujeres, presentándose en una relación aproximada de 3:1 con respecto al sexo masculino (11, 12).

La mayor frecuencia de AR en las mujeres se atribuye, en parte, a los efectos estimulantes del estrógeno en el sistema inmune. Pero aún existe controversia sobre el papel de los factores hormonales en el desarrollo de la AR.

En las mujeres, la nuliparidad a menudo aumenta el riesgo de AR, mientras que el embarazo a menudo se asocia con la remisión de la enfermedad, aunque los brotes de la enfermedad son comunes en el período posparto (13).

Además, muchas mujeres debutan de su enfermedad cerca de la mediana edad o de la menopausia. Los hombres suelen tener un inicio tardío de la enfermedad, son más propensos a ser positivos para FR y tienen títulos más altos de ACPA (2, 13).

TABACO

El tabaco es el factor ambiental más importante de la AR, tanto por el peso en la enfermedad como ser por prevenible. El fumar tiene un efecto dosis-dependiente en el riesgo de desarrollar AR variando entre un 26-94% según la carga tabáquica acumulada (14). El riesgo llega a duplicarse entre los fumadores con un historial de 20 años de consumo en comparación con los no fumadores (15), pero incluso los fumadores con una baja exposición se ven afectados (14).

El aumento del riesgo podría estar mediado por modificaciones epigenéticas, ya que el tabaquismo puede generar hipometilación de ciertas regiones de ADN, efecto contrario al producido con el tratamiento con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAMEs) (16).

El tabaquismo se asocia con mayores niveles de citocinas proinflamatorias y mayor actividad de la enfermedad (17). La relación parece ser más fuerte en los enfermos ACPA positivos y en aquellos con al menos una copia del epítipo compartido (18).

INHALACIÓN DE POLVO INORGÁNICO

Otro factor de riesgo medioambiental es la exposición a la sílice (19). La exposición laboral al polvo textil también se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar AR en una población de mujeres de Malasia (20).

MICROBIOTA

La microbiota parece englobar un vínculo entre el medio ambiente, la genética, y la autoinmunidad en la AR.

La periodontitis también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar AR. Ambas entidades comparten ciertas similitudes, como la inflamación crónica y erosiones óseas (21). Se cree que la relación está mediada en parte por la microbiota oral (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (22, 23).

La relación no está circunscrita a la microbiota oral, también la microbiota intestinal parece desempeñar un papel importante en la enfermedad.

Diferentes observaciones respaldan esta teoría: 1) una menor diversidad de la microbiota intestinal en individuos con AR en comparación con la población general; 2) el aumento de especies infrecuentes (actinobacterias) en pacientes con AR (24); 3) mayor colonización intestinal de *Prevotella copri* en los pacientes con AR temprana no tratado en comparación con aquellos con enfermedad establecida o la población general (25); 4) una secuencia peptídica casi idéntica entre especies bacterianas intestinales y autoantígenos aislados a partir de moléculas HLA-DR de pacientes con AR (26).

OTROS FACTORES

Los factores de estilo de vida modificables también se han implicado en la AR. Por ejemplo, la obesidad se ha asociado de manera constante e independiente con un aumento modesto en el riesgo de AR, con una odds ratio de 1.45 en aquellos con obesidad en comparación a los normo-pesos según el índice de masa corporal (27).

Una dieta sana y equilibrada como la dieta mediterránea, parece disminuir el riesgo de AR en el estudio sueco EIRA (28).

También se ha reportado que el consumo moderado de alcohol a largo plazo reduce el riesgo de AR (29).

1.3 Etiopatogenia

El desarrollo de la AR está determinado por un genotipo predisponente sobre el cual los factores ambientales operan para dar lugar a la respuesta inflamatoria en la sinovial. Aún continuamos sin comprender completamente cómo y cuándo interactúan todos los agentes involucrados.

Los factores ambientales como el tabaco pueden actuar sobre las células de la mucosa respiratoria y promover la conversión postraduccional de aminoácidos (por ejemplo, arginina a citrulina) contenidos en una amplia variedad de proteínas, incluidas las proteínas intracelulares (histonas) y las proteínas de la matriz (fibronectina, colágeno, fibrinógeno, enolasa y vimentina). Todo ello sucede mediante la inducción de peptidil arginina deiminases en un proceso enzimático llamado citrulinación (también conocido como deiminación) (30).

La microbiota también puede inducir la citrulinación mediante la *P. gingivalis*, bacteria común en la periodontitis. Este microorganismo expresa peptidil arginina deiminases y puede inducir la citrulinación y, por lo tanto, promover la generación de ACPA (31).

Además de la citrulinación, existen otras modificaciones postraduccionales como la acetilación o carbamilación que han sido descritas de forma más reciente y que comentaremos más adelante.

Los péptidos modificados se unen a los heterodímeros de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad, especialmente aquellos que contienen el epítipo compartido, lo que lleva a la presentación de antígeno a las células T, que a su vez estimulan las células B para sintetizar una gama de anticuerpos que reconocen autoproteínas.

Los anticuerpos que reconocen autoproteínas son los anticuerpos contra proteínas modificadas (AMPAs) y se dirigen a proteínas citrulinadas,

homocitrulinadas y acetiladas (32). Hasta este punto podríamos considerar que es la respuesta normal y esperada del sistema inmune frente a un antígeno.

La presencia de autoanticuerpos (como los AMPA y FR), citocinas y quimiocinas proinflamatorias circulantes se pueden detectar varios años antes del inicio de la enfermedad clínica, lo que apunta a la activación inmune durante el período preclínico (33). Pero las muestras de biopsia sinovial de individuos con artralgias positivas para autoanticuerpos a menudo son normales (34), aunque es posible encontrar infiltración sinovial de células inflamatorias en ausencia de signos y síntomas clínicos (35).

Los AMPAs también se asocian con un curso de enfermedad más grave y, por lo tanto, no son solo marcadores de diagnóstico sino también marcadores pronósticos (36).

La presencia de AMPAs por sí sola no es suficiente para causar sinovitis. Probablemente se requiera un estímulo adicional (por ejemplo, formación de inmunocomplejos o la activación del complemento) para iniciar una sinovitis clínica.

LA SINOVIAL

La AR es una enfermedad sistémica que involucra varios eventos inmunológicos que ocurren fuera de la articulación. No obstante, la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales es la diana del proceso inflamatorio en esta entidad.

Existen dos cambios patogénicos vitales en la membrana sinovial de pacientes con AR. Primero, el revestimiento íntimo se expande debido a un aumento y activación de sinoviocitos, que son una fuente prominente de citocinas y proteasas. Estos son responsables del daño del cartílago y poseen el potencial de migrar de una articulación a otra propagando la enfermedad (37, 38). El segundo cambio es la infiltración de células del sistema inmune adaptativo en la sinovial. Aproximadamente la mitad son células T CD4+, que se infiltran en el tejido y

forman centros germinales ectópicos en los que las células B proliferan, se diferencian y producen anticuerpos. Las células B y células plasmáticas también están presentes en la sinovial produciendo autoanticuerpos (39). Sin embargo, la contribución relativa de las vías sinoviales en la patogénesis no está claramente dilucidado, ya que la mayor parte de la maduración por afinidad ocurre antes del inicio de la enfermedad clínica.

DAÑO ARTICULAR

El daño al cartílago y al hueso subcondral debido a la invasión sinovial en estructuras articulares adyacentes es un signo cardinal de la AR. Las vías involucradas son muchas y varían entre los enfermos que son positivos para ACPA y los ACPA negativos. Los macrófagos, los neutrófilos y los mastocitos contribuyen al daño articular mediante la liberación de citocinas y metaloproteinasas de la matriz (MMP). Pero, las células predominantes en la destrucción del cartílago son los sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS)-100 cadherina-11 positivo. Estos últimos producen varias MMP, como colagenasas y estromelisininas (40).

Las erosiones óseas se deben en gran medida a la maduración y activación de los osteoclastos por el activador del receptor del ligando del factor nuclear κ B producido por células T, junto con TNF, IL-6 e IL-1 producidas por macrófagos y FLS en el revestimiento sinovial (41).

CITOQUINAS Y REDES DE SEÑALIZACIÓN

Varios estudios han demostrado un papel proinflamatorio del factor de necrosis tumoral y la IL-6 en la activación de leucocitos, la producción de MMP, la angiogénesis y la promoción del dolor. Es en la sinovial donde se producen las citoquinas que actúan de forma paracrina o autocrina y pueden promover y perpetuar la inflamación de la AR.

La hipótesis de la red de citoquinas ha conducido a la introducción exitosa de agentes terapéuticos inmunodirigidos. Sin embargo, la diversidad de citoquinas y

la heterogeneidad en la respuesta a los tratamientos avanzados inmunodirigidos sugieren que el fenotipo clínico de la AR representa un síndrome en lugar de una entidad única.

1.4 Fases de la Enfermedad

La patogénesis de la AR comienza mucho antes, incluso años de que los síntomas se manifiesten. En realidad, la AR se contempla como una secuencia continua que comienza con una etapa de alto riesgo o susceptibilidad que se basa principalmente en factores genéticos y ambientales. La secuencia continúa hacia la AR preclínica y posteriormente surge la inflamación articular (AR temprana). Finalmente, en los individuos donde la inflamación no se resuelva y se perpetúa, se desarrolla la AR establecida. Se cree que los mecanismos implicados operan a través de este continuo patológico, creando oportunidades para intervenciones específicas en cada etapa que podrían prevenir la enfermedad.

La expresión "AR preclínica" se utiliza para definir aquella fase de la enfermedad en que se pueden observar fenómenos autoinmunes sistémicos (por ejemplo, autoanticuerpos circulantes) en ausencia de sinovitis persistente clínicamente evidente (42).

Para estandarizar la terminología de las fases que conducen a la AR, la liga europea contra el reumatismo (EULAR) ha propuesto una nomenclatura, que incluye seis categorías o fases: 1) factores de riesgo genéticos 2) factores ambientales, 3) autoinmunidad sistémica asociada con AR, 4) síntomas sin artritis clínica, 5) artritis indiferenciada, 6) AR. Estas fases son el resultado y están limitadas al conocimiento actual sobre la etiología de la AR.

Es relevante notar que este concepto no implica que todos los enfermos progresen a través de todas las fases, o que las fases individuales sean mutuamente excluyentes. Además, el término, AR preclínica solo debe usarse en

forma retrospectiva, ya que muchos de los sujetos en riesgo nunca desarrollarán artritis clínica (43).

Con cierta frecuencia podemos encontrar personas que aquejan de "dolor articular" tiempo antes de la aparición de la artritis. No obstante, debemos tener en cuenta que la artralgia es un síntoma inespecífico y prevalente en la población general. Solamente, una minoría de estos individuos con artralgias son referidos al reumatólogo, y un reducido número de pacientes será diagnosticado de AR. Debemos recordar que la naturaleza biológica del dolor "articular" es muy diversa, por lo tanto, el riesgo de progresar a AR varía según el escenario.

Recientemente, EULAR desarrolló una definición de artralgia clínicamente sospechosa de progresión a AR (44) que discrimina con alta sensibilidad a los individuos en riesgo de desarrollar esta enfermedad (45). Si además a este concepto le sumamos la presencia de biomarcadores como los anticuerpos y reactantes de fase aguda el cribado será también altamente específico (46, 47).

Aparte de la artralgia clínicamente sospechosa, contamos con otros grupos en riesgo de desarrollar AR. Entre estos podemos destacar; las artralgias seropositivas, los síntomas musculoesqueléticos inespecíficos seropositivos, el reumatismo palindrómico y los familiares en primer grado de pacientes con AR.

Al hablar de pre-AR o AR preclínica, estamos casi obligados a introducir la AR establecida ya que son fases entrelazadas de la misma enfermedad. Habitualmente relacionamos la AR establecida con la inflamación crónica y una alta carga de enfermedad con daño articular y acompañada de comorbilidades consecuentes a la inflamación crónica.

Una definición cronológica no nos asegura una clara diferenciación entre la enfermedad temprana y la establecida, porque el diagnóstico puede retrasarse significativamente. Del mismo modo, una definición radiológica tampoco asegura una clara diferenciación, debido a la gran variabilidad en la población de

pacientes con AR, donde algunos pacientes nunca desarrollan daño estructural, incluso después de muchos años de enfermedad (48).

No existe una definición aceptada universalmente de AR establecida, pero varios expertos recomiendan utilizar el término AR establecida desde el momento de un diagnóstico clínico definitivo, independientemente de la duración de los síntomas o la presencia de daño irreversible, para distinguir la enfermedad establecida de una etapa de artritis indiferenciada o pre-AR, que quizás nunca progrese a AR (48).

Identificar a las personas en riesgo de AR es de vital trascendencia. El racional de un diagnóstico y tratamiento temprano es para aprovechar la ventana de oportunidad o el período en el que la inflamación es más susceptible a medidas preventivas (intervenciones dietéticas y de estilo de vida) y a los tratamientos inmunomoduladores.

1.5 Manifestaciones clínicas

El diagnóstico de AR es fundamentalmente clínico. Aunque no existen criterios de diagnóstico, los criterios de clasificación que incluyen manifestaciones clínicas y pruebas serológicas (autoanticuerpos y reactantes de fase aguda) informan el diagnóstico clínico.

MANIFESTACIONES ARTICULARES

La tumefacción de la articulación junto con el dolor de carácter inflamatorio son las características clínicas clave de la AR. La terminología clínica de AR temprana, establecida y tardía, se ajusta bastante a la caracterización de diferentes fases de la enfermedad, que padecen la gran mayoría de pacientes. Podríamos definir las de la siguiente manera (49):

AR temprana: caracterizada por una inflamación leve, apenas perceptible, de las articulaciones. No suele encontrarse lesiones óseas en las radiografías.

AR establecida: además de la tumefacción más clara, puede acompañarse de diversas deformidades, incluida la subluxación en las articulaciones, las deformidades en cuello de cisne o la deformidad Z del pulgar. En esta fase las radiografías ya pueden mostrar estrechamiento del espacio articular, erosiones óseas y subluxaciones articulares.

AR tardía y grave: puede presentarse con afectación mutilante de las articulaciones. En las radiografías se observan cambios en el cartílago entre los huesos del carpo generalmente, los cuales se agotan y se unen para formar casi un tipo de hueso 'único', erosiones graves, deformidades de lápiz en copa y la destrucción ósea de huesos largos como por ejemplo el radio y el cúbito. En esta fase incluso se puede llegar a afectar el esqueleto axial con formación grave de pannus, típicamente en la articulación atlantoaxial, pudiendo llegar a comprimir la médula. Hoy en día, la evolución hasta la fase mutilante, que compromete gravemente la movilidad e incluso conducir a un estado de postración en cama, rara vez se ve.

Las articulaciones involucradas en la AR son bastante específicas y distintas en comparación a otras enfermedades articulares. Suele afectar las articulaciones metacarpofalángicas y la articulación interfalángica proximal de manos y en los metatarsofalángicas de los pies, y las articulaciones de muñeca, tobillo, codo, hombro, rodilla y cadera (50).

En esta enfermedad hay un claro predominio por las articulaciones periféricas. El predominio de las articulaciones interfalángicas distales es excepcional. La afectación de la región cervical en especial de articulación C1-C2 (atlantoaxial) es relativamente frecuente. La AR también se distingue de otras formas de artritis por su naturaleza altamente destructiva, que conduce a la degradación inflamatoria del cartílago y la destrucción del hueso articular y periarticular.

A pesar de estos hallazgos típicos, muchas entidades imitan la AR, lo que dificulta el diagnóstico diferencial, particularmente en la fase temprana. Entre ellos se

incluyen la artritis viral, artritis de Lyme, enfermedad mixta del tejido conectivo, espondiloartritis periférica, artritis psoriásica, artrosis (especialmente la forma erosiva) y enfermedades metabólicas, especialmente la artritis por microcristales.

MANIFESTACIONES SISTÉMICAS

La AR es una enfermedad inflamatoria sistémica, que puede afectar diferentes órganos y sistemas como los ojos, pulmones, sistema nervioso y corazón entre otros.

Los nódulos reumatoides y la vasculitis son dos de las manifestaciones extraarticulares típicas. Suelen observarse en la AR grave, aunque hoy en día son menos comunes.

La enfermedad pulmonar intersticial es considerada como la manifestación extraarticular más grave de la AR, ya que se acompaña de una alta mortalidad y su incidencia parece estar aumentando, probablemente debido a una mayor conciencia de su existencia por parte de la comunidad médica.

La AR también puede acompañarse del síndrome de Sjögren secundario y fatiga. Además, el proceso inflamatorio crónico puede conducir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, amiloidosis, osteoporosis y linfoma.

Existe aún cierto debate en como categorizar estas manifestaciones (manifestaciones extraarticulares vs. complicaciones de la enfermedad vs. comorbilidades). Independientemente de ello, cada vez tenemos más claro que la aparición de éstas se correlaciona con la carga inflamatoria de la enfermedad y que pueden atenuarse o incluso desaparecer con un tratamiento efectivo de la AR (51, 52).

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

La falta de criterios de diagnóstico para la AR se debe sobre todo a la heterogeneidad interindividual e intraindividual de la enfermedad.

Como para la mayoría de las otras afecciones reumatológicas, solo están disponibles los criterios de clasificación. Los criterios de clasificación actuales son los del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y EULAR establecidos en 2010 (ver Tabla 1.1) los cuales son sensibles, pero con una especificidad relativamente baja (53).

Tabla 1.1 Criterios de Clasificación de AR ACR/EULAR 2010

Variables	puntaje
Articulaciones comprometidas	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
Serología	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	1
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	2
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
Duración de los síntomas	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1

Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6

Debemos recordar que el objetivo de los criterios es estratificar a los pacientes con características similares para la investigación clínica. Se pueden emplear para

la toma de decisiones de diagnóstico en la práctica clínica, pero con riesgo de clasificar positivamente a un paciente con un diagnóstico negativo o viceversa (54), y por lo tanto el criterio del reumatólogo sigue siendo importante.

1.6 Manejo y tratamiento

A finales del siglo pasado, la AR era considerada como una enfermedad altamente discapacitante con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, para la que no existían tratamientos muy efectivos. Sin embargo, en las últimas décadas, hemos sido testigos de una mejora espectacular en el pronóstico y los desenlaces de esta enfermedad. Todo ello se debe a varios cambios en el paradigma en el manejo y tratamiento de la AR.

Primero, hemos aprendido a cómo usar los FAMEs como el metotrexato (MTX) de manera óptima, y este fármaco se ha convertido en la piedra angular terapéutica (55). En segundo lugar, se han desarrollado instrumentos fiables para la evaluación clínica que pueden utilizarse para la investigación y la práctica clínica como los índices compuestos de actividad de la enfermedad, donde destaca el DAS28, que nos permiten monitorizar y estratificar a los pacientes. En tercer lugar, el diagnóstico temprano y el inicio rápido de una terapia han demostrado ser eficaces (56) y se han vuelto prácticamente obligatorios, tanto es así que dieron lugar a nuevos criterios de clasificación que involucran a pacientes con AR temprana (53). En cuarto lugar, la estrategia del tratamiento ha cambiado, con un enfoque de tratamiento por objetivos ("treat to target") junto con un control estricto ("tight control") de los síntomas clínicos y la pronta adaptación del tratamiento (56, 57). Estos objetivos son cada vez más ambiciosos y buscan la obtención de la remisión. Finalmente, la introducción de las nuevas terapias inmunodirigidas en el campo de la AR, han proporcionado una gran efectividad en aquellos casos que fallan o no toleran las terapias convencionales. Estos son los pilares que han sentado la base para la obtención de la considerable mejoría en el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con AR en los últimos años.

En cuanto a fármacos, los agentes sintomáticos, como los analgésicos o los AINE, mejoran los signos y síntomas, pero no modifican el proceso subyacente y, por lo tanto, no interfieren con los mecanismos que conducen al daño articular, aunque alivian el dolor y la hinchazón generalmente debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Los glucocorticoides tienen actividad modificadora de la enfermedad, pero sus efectos adversos impiden su uso a largo plazo. No obstante, dada su rápida actividad antiinflamatoria, pueden administrarse durante un período limitado junto con los FAMES hasta que estos últimos hayan ejercido su máxima capacidad antiinflamatoria.

Como hemos mencionado antes la AR es una enfermedad inflamatoria sistémica, por lo que su tratamiento requiere de la interferencia del proceso inflamatorio mediante el uso de FAMES. Entre estos agentes terapéuticos se distinguen los FAMES sintéticos convencionales y las terapias inmunodirigidas avanzadas.

Los FAMES sintéticos convencionales son un grupo heterogéneo de medicamentos compuesto por fármacos químicos. Dentro de esta familia contamos con agentes cuyos modos de acción no son del todo conocidos como el MTX, sulfasalazina, cloroquina, hidroxiclороquina o sales de oro. Además de la leflunomida cuya diana terapéutica (inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa) está claramente definida.

Hoy en día contamos con 5 familias de terapias inmunodirigidas avanzadas (ver Tabla 1.2). Los inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF), los inhibidores del receptor de IL-6 y los inhibidores de la Janus-quinasa. Estas terapias bloquean la acción de las citocinas proinflamatorias implicadas en el inicio y progresión de la AR. También contamos con el rituximab (un agente que reduce los linfocitos B) y abatacept (se dirige a la coestimulación de las células T) que se dirigen contra eventos iniciales en la producción de citocinas, que conducen finalmente a una regulación a la baja de estas citocinas proinflamatorias (58).

Tabla 1.2 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad para la AR según diana terapéutica.

FAMEs sintéticos convencionales	
Diana no claramente definida	<i>MTX, sulfasalazina, cloroquina, hidroxicloroquina y sales de oro</i>
Dihidroorotato deshidrogenasa	<i>Leflunomida</i>
Terapias inmunodirigidas avanzadas	
<i>Factor de necrosis tumoral</i>	<i>Adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab e infliximab</i>
<i>Receptor de IL-6</i>	<i>Tocilizumab y sarilumab</i>
<i>CD80 y CD86 (implicados en la coestimulación de células T):</i>	
<i>CD20 (expresado por células B)</i>	<i>Rituximab</i>
<i>Janus quinasas</i>	<i>Tofacitinib, baricitinib, upadacitinib y filgotinib</i>

En general, todas estas terapias han demostrado ser eficaces con una seguridad aceptable en ensayos clínicos y estudios observacionales. Pero varios metaanálisis y ensayos comparativos han revelado que cuando se combinan con MTX, todas las terapias inmunodirigidas avanzadas tienen una eficacia similar en prácticamente todos los objetivos estudiados, independientemente de su diana (58-61). Desconocemos la razón de este techo terapéutico, la hipótesis de cuello de botella parece ser la causa más probable. Dicha hipótesis expone que independientemente de la diana del tratamiento, todos los agentes apuntan a disminuir los efectos del TNF y / o IL-6, explicando la similitud de las tasas de respuesta general (49).

En un entorno de la vida real, el 30-40% de los pacientes tratados con terapias inmunodirigidas experimentan la interrupción del fármaco debido a ineficacia o

a eventos adversos (62, 63). Es importante resaltar, que la tasa de respuesta disminuye con el aumento de la duración de la enfermedad o al número fracasos de líneas de tratamiento previas (64, 65).

Desconocemos hoy en día la mejor estrategia a seguir en los pacientes que han fracasado a un FAMEsc (básicamente MTX), ya que como comentamos los diferentes fármacos biológicos y terapias sintéticas dirigidas (inhibidores de JAK) obtienen resultados similares. Esta circunstancia se refleja en las recomendaciones internacionales para manejo de AR, donde no se prioriza una terapia sobre otra (55, 66).

A pesar de no existir una jerarquía terapéutica, datos de registros nacionales muestran que los anti-TNF se utilizan como primera opción en la gran mayoría de los casos (>70%) (67, 68). Posiblemente, se debe a que históricamente fueron los primeros agentes disponibles. Además, ejemplifica la carencia de conocimientos basados en la evidencia para elegir el tratamiento más adecuado, por lo que estos fármacos se prescriben de forma de “prueba y error”. Empujando a los médicos a realizar una rotación empírica entre los diferentes fármacos, hasta encontrar el fármaco correcto. Mientras tanto, los no respondedores están innecesariamente expuestos a eventos adversos junto con el empeoramiento de su condición.

Por otra parte, esta forma de actuar acarrea a una disminución en la rentabilidad de los tratamientos y aumenta la carga económica (69). Al contrario de lo que sucede con la tasa de respuesta, los costes sanitarios aumentan de forma gradual a medida que se incrementa el número de fracasos de tratamientos (70).

Así pues, una de las necesidades insatisfechas en el tratamiento de la AR, es que no podemos predecir en virtud de biomarcadores que paciente individual responderá mejor a un determinado fármaco.

Los ACPA constituyen un biomarcador de mal pronóstico en la AR (71), también la presencia de estos anticuerpos marca una mejor respuesta a ciertos agentes

terapéuticos como pueden ser el abatacept (ABA) y rituximab (60, 72). Concretamente en el caso de ABA, existe una amplia evidencia que apoya su uso en los pacientes ACPA positivos derivada de ensayos clínicos y grandes estudios observacionales (73, 74). Adicionalmente, este tratamiento parece modular la respuesta hacia los antígenos citrulinados, observándose una disminución progresiva en los títulos de ACPA con el tratamiento con ABA (75).

No obstante, todavía se necesita mucha más investigación para vincular los factores (genéticos, epigenéticos, ambientales, anticuerpos, etc.) como biomarcadores de respuesta para tener éxito en la búsqueda de terapias eficaces. Por lo tanto, la medicina de precisión sigue siendo un tema fundamental en la agenda de los científicos básicos y clínicos, que esperamos sea logrado dilucidar en un futuro próximo.

REUMATISMO PALINDRÓMICO

El reumatismo palindrómico (RP) es un síndrome clínico particular caracterizado por brotes de dolor, tumefacción y eritema, que afecta a la articulación y a los tejidos circundantes, y que se resuelve sin causar un daño residual. Los brotes son a menudo monoarticulares, duran solo horas o unos pocos días y su frecuencia es muy variable (76). Es relativamente frecuente encontrar pacientes con RP en la práctica clínica de un reumatólogo. Sin embargo, el diagnóstico puede ser desafiante dado que los brotes son transitorios e impredecibles, y el examen físico, las pruebas de laboratorio y de imagen generalmente son normales. Asimismo, no existen criterios de clasificación universalmente utilizados para esta entidad.

Los pacientes con RP pueden evolucionar a una enfermedad reumática crónica, la mayoría de las veces a AR (77-79). Esta entidad comparte varias características con la AR, incluidos los factores genéticos, los autoanticuerpos y la distribución de las articulaciones afectadas, sugiriendo que podría ser una forma recurrente-remitente de AR. No obstante, la naturaleza de los brotes del RP no son típicos de un fenotipo autoinmune, más bien se asemejan más al de un proceso autoinflamatorio (80). Considerando lo anterior, no está claro si el RP es un síndrome clínico separado, una forma abortiva de AR o simplemente una fase preclínica de AR.

2.1 Epidemiología

La prevalencia exacta del RP es desconocida. Existen muy pocos estudios que analicen la frecuencia de esta enfermedad.

En una cohorte retrospectiva de 4900 pacientes con enfermedades musculoesqueléticas, se encontró una prevalencia de RP del 3% aproximadamente (81). De forma reciente, se ha reportado que hasta el 42% de los pacientes con AR, presentan síntomas compatibles con RP previo al debut de

la AR (82). En España, un estudio multicéntrico catalán documentó que el 16% de los pacientes con AR inician en forma de RP (83). Similar a la AR, la distribución por sexo predomina en el sexo femenino, pero la edad de aparición parece ser ligeramente inferior (84).

2.2 Etiopatogenia

El RP y la AR presentan una relación muy estrecha, comparten perfil inmunogénico y serológico.

La alta prevalencia de autoanticuerpos en los pacientes con RP fue descrita por primera vez en 1977 por Wajed *et al.* Aquel estudio reportó, positividad del FR en 15 de 39 pacientes con RP (85). En 2003, se describió por primera vez la presencia de ACPA (86), desde entonces varios estudios han confirmado la alta prevalencia de estos dos anticuerpos en esta población, en especial los ACPA (en torno a 39-68%; ver Tabla 2.1) (79, 87-89).

Tabla 2.1. Prevalencia de Anticuerpos en el Reumatismo Palindrómico

Autor (año)	N casos	Duración meses	FR+ %	ACPA+ %
Salvador <i>et al.</i> (2003)	32	90	42	56
Russell <i>et al.</i> (2006)	61	<12	51	55
Powell <i>et al.</i> (2008)	51	42	53	49
Tamai <i>et al.</i> (2010)	28	63	82	46
Khabazzi <i>et al.</i> (2012)	69	47	46	42
Emad <i>et al.</i> (2014)	90	15	33	39
Cabrera-Villalba <i>et al.</i> (2014)	54	139	57	67
Mankia <i>et al.</i> (2018)	79	*	*	59

* no reportado

Característicamente las concentraciones de ACPA en los pacientes con RP suelen ser similares a las observadas en la AR. No obstante, difieren en sus características

ya que en los pacientes con RP la respuesta a antígenos citrulinados suele estar más restringida respecto al número de especificidades antigénicas reconocidas y utiliza con menor frecuencia los isotipos IgA e IgM (90).

También hay evidencia de similitud genética entre ambas entidades. En la década de 1980 se evidenció, en grupos relativamente pequeños de pacientes con RP, la presencia de diferentes antígenos HLA (91-93). Un estudio canadiense de principios del siglo XXI reportó una alta prevalencia (65%) del alelo del epítipo compartido, principalmente por los alelos DRB1-0401 y DRB1-0404. El mismo estudio también reveló que solo la homocigosidad para los alelos epítipo compartido era un factor de riesgo independiente significativo para la progresión hacia una enfermedad crónica (94). De forma interesante, algunos de los alelos (HLA DRB1 * 03 y * 1302) reportados en el RP, no se han descrito en la AR (95).

Los típicos brotes agudos pero transitorios que caracterizan el RP sugieren una respuesta del sistema inmune innato que se asemejan a un fenotipo autoinflamatorio en lugar de un genotipo autoinmune típico. La presencia de genes autoinflamatorios en pacientes con RP, se analizó en un estudio español observándose que un 12% de casos eran portadores de mutaciones en el gen de la fiebre mediterránea familiar (MEFV). Dichas mutaciones se observaron casi exclusivamente en pacientes sin autoanticuerpos. Este estudio sugiere que algunos casos de RP seronegativo podrían estar relacionado con mutaciones del MEFV incluso en ausencia de criterios diagnósticos de FMF (96).

Aunque en estudios de imagen se ha observado afectación de la membrana sinovial (sinovitis) similar a la AR durante las crisis palindrómicas (97), otros apuntan a que el RP presenta una mayor apetencia por los tejidos extracapsulares (98, 99). La "inflamación extracapsular" durante los episodios agudos engloba a la tenosinovitis y la inflamación periarticular de los tejidos blandos, en ausencia de sinovitis intraarticular. Dichos hallazgos suelen estar ausentes durante el periodo inter-crisis (98), confirmándose la naturaleza intermitente del proceso en

la mayoría de casos. La afectación de los tejidos extracapsulares también se ha encontrado en otras formas de AR preclínica. Los eventos intermedios entre la inflamación extracapsular y la progresión de la inflamación sinovial evidentes en la AR son aún desconocidos (80, 100).

El RP parece un síndrome de superposición compuesto por la autoinmunidad y autoinflamación. Es posible que dentro del RP emerjan distintas entidades con un fenotipo clínico similar, que varía desde las formas más clásicas asociadas a autoanticuerpos con frecuente evolución a AR hasta formas asociadas a genes autoinflamatorios especialmente en pacientes seronegativos.

2.3 Manifestaciones Clínicas y Criterios Diagnósticos

Los brotes autolimitados de muy corta duración (usualmente <72 horas) de dolor, tumefacción y en ocasiones eritema por inflamación articular y periarticular, que no causan daño residual es la marca distintiva del RP. De hecho, en la descripción original del RP, Hench y Rosenberg eligieron el nombre "reumatismo palindrómico" en lugar de "artritis palindrómica" sobre la base de la periartritis observada en algunos de sus pacientes (101), hallazgos que han sido confirmados de forma posterior. (76, 102).

La distribución de las articulaciones afectadas es similar a la de la AR, ambas tienen predilección por articulaciones periféricas, siendo las muñecas, las metacarpofalángicas y las interfalángicas proximales las articulaciones más frecuentemente afectadas. La afectación del esqueleto axial es anecdótica y cuando se presentan, debemos considerar otras alternativas diagnósticas (76, 87, 88, 102).

En el curso evolutivo de la enfermedad las crisis palindrómicas alternan con periodos asintomáticas inter-crisis con una periodicidad variable entre pacientes (89). Típicamente los brotes son monoarticulares, aunque pueden ser oligoarticulares y más raramente poliarticulares (90).

La definición de caso de RP es controvertida. Varios autores han propuestos sus propias definiciones de caso o criterios de clasificación, pero ninguna de estas es universalmente aceptada, por lo que el diagnóstico continúa basándose en el juicio clínico. A pesar de ello, los diferentes criterios parecen coincidir en algunos aspectos: una duración de los síntomas de al menos 6 meses, ausencia de lesiones radiológicas, observación directa de un brote por un médico, duración de la crisis inferior a una semana y la exclusión de otras causas de artritis (76, 81, 103).

Los criterios propuestos por Guerne y Weisman en 1992, son los más utilizados. Para cumplir con la definición de RP, el paciente debe cumplir los siguientes 5 criterios: una historia de 6 meses de episodios breves, repentinos y recurrentes de monoartritis o, raramente, poliartritis o inflamación del tejido blando; observación directa de un ataque por un médico; la participación de al menos tres articulaciones en diferentes ataques; la ausencia de erosiones en las radiografías; y la exclusión de otras formas de artritis (76). Debe tenerse en cuenta el diagnóstico diferencial con otras entidades especialmente las artritis por microcristales, la enfermedad de Whipple y la fiebre mediterránea familiar entre otros.

2.4 Progresión a la artritis reumatoide y otras enfermedades

Un alto porcentaje de pacientes con RP progresan a AR. En comparación a la población general, los pacientes con RP presentan un riesgo de >100 veces de padecer de AR según un estudio poblacional (104).

El primer estudio longitudinal en esta población publicado en 1959, constató progresión hacia AR en 18 de 28 pacientes con RP (64%) tras 8 años de seguimiento (105). Desde entonces varias cohortes de diferentes puntos geográficos han confirmado la alta tasa de progresión, que va desde un 23% hasta un 58% (77-79, 102, 106). La disparidad en las tasas de progresión podría deberse

a diferencias en los criterios de inclusión, duración de los síntomas, tratamientos recibidos, diseño de los estudios y a las diferencias étnicas.

Los pacientes con RP presentan una alta prevalencia de anticuerpos relacionados con la AR. Estos anticuerpos parecen jugar un papel importante en la progresión hacia la AR. En realidad, son los biomarcadores más estudiados hasta la fecha, en especial los ACPA. Las tasas de progresión hacia una AR prácticamente se duplican cuando el paciente presenta estos anticuerpos (78, 88). Una cohorte de RP española, encontró una razón de probabilidad positiva del estado ACPA para la AR del 1,45 tras un seguimiento a largo plazo (78). Además, la ausencia de dichos anticuerpos tiene un alto (81%) valor predictivo negativo para la progresión hacia AR (79). A pesar de la importante correlación de los ACPA con la progresión hacia AR, no todos los RP seropositivos desarrollan AR incluso después de un seguimiento a largo plazo (78). Otros factores de riesgo que se han relacionados con la progresión, entre los que podemos mencionar; el FR, homocigosidad para alelos HLADRB* del epítipo compartido, la afectación de las articulaciones de las manos y el sexo femenino (78, 79, 81, 87, 94).

También se ha descrito progresión a otras enfermedades como el lupus, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, vasculitis y miopatías inflamatorias entre otras (78, 81). En comparación a la AR, las tasas de progresión hacia estas enfermedades son mucho menores (104).

El tabaquismo es el factor ambiental más vinculado a la AR y a la generación de anticuerpos. Aunque se ha reportado una alta prevalencia de tabaquismo (63%) en la población de pacientes con RP (82), hasta la fecha no se ha estudiado si el tabaco es un factor de riesgo para desarrollar AR en pacientes con RP.

Un pequeño estudio observacional, encontró que hasta 1 de cada 3 pacientes con RP puede presentar brotes desencadenados por la ingestión de ciertos alimentos (pescado, huevos, verduras enlatadas y queso procesado). De forma interesante, el evitar dichos alimentos resultó en el cese completo o parcial de los brotes

palindrómicos y la reexposición al mismo resultó en la reanudación de los síntomas (107).

Los programas para dejar de fumar podrían prevenir en algunos casos la progresión hacia AR sin incurrir en riesgos. Otras estrategias de modificación de factores de riesgo podrían incluir una dieta saludable, pérdida de peso y la eliminación de posibles desencadenantes en la dieta. No obstante, carecemos de estudios sobre la relación de otros factores asociados con el estilo de vida y el RP.

2.5 Tratamiento

A fecha de hoy, no contamos ensayos clínicos que respalden el uso de un fármaco sobre otro en el RP. En la literatura podemos encontrar algunos estudios observacionales, retrospectivos, con un tamaño de muestra relativamente pequeño que demuestran cierta eficacia de tratamientos utilizados en la AR para controlar la actividad enfermedad en el RP.

En un estudio israelí, se observó una respuesta favorable a los AINEs sobre brotes palindrómicos típicos (108), pero este hallazgo no ha sido reproducido en otras cohortes (109).

Algunos FAMEs utilizados en el pasado para la AR, como la sulfasalazina, penicilamina y la sales de oro (108, 110) parecen tener buenas tasas de respuesta en el control de los brotes. No existen estudios sobre la eficacia de FAMEs más contemporáneos como el MTX, leflunomida o terapias biológicas.

Los antimaláricos (colchicina e hidroxiclороquina), además de reducir la frecuencia y gravedad de los brotes (111), son los únicos fármacos que parecen retrasar, pero no evitar el tiempo hasta el desarrollo de artritis persistente (106). Un estudio retrospectivo que incluía 113 pacientes con RP evidenció que el uso de antimaláricos redujo el riesgo de desarrollar AR. Aunque las proporciones de pacientes tratados y no tratados (24% vs 35%) con estos agentes que finalmente desarrollaron AR no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa, la

mediana de tiempo de progresión fue de 162 meses en aquellos tratados con antimaláricos y de 56 en los no tratados (106).

La verdadera eficacia de los medicamentos debe considerarse con precaución por el diseño de los estudios. La búsqueda de un tratamiento efectivo es de sumo interés, dado que una intervención terapéutica efectiva en esta fase podría hipotéticamente evitar el paso a artritis crónica a estos pacientes.

ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A LA ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una enfermedad inflamatoria sistémica. Durante su curso se pueden producir manifestaciones extraarticulares sobre la piel, los ojos, el corazón, el sistema nervioso o los pulmones (112). El sistema respiratorio es donde la AR extraarticular se manifiesta más comúnmente, afectando entre un 60-80% de los pacientes (113).

La enfermedad pulmonar asociada con la AR es capaz de afectar cualquiera de los compartimientos pulmonares. Puede ser secundaria a la misma AR subyacente, o ser desencadenada por una infección o como toxicidad de algún fármaco. Entre las formas de afectación pulmonar en la AR, la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es de gran interés, debido a que se asocia con una alta morbimortalidad (114, 115).

El período preclínico de la AR se caracteriza por la aparición de autoanticuerpos y marcadores de inflamación sistémica (citoquinas proinflamatorias y quimiocinas) que son detectables en la sangre y en el pulmón, en ausencia de síntomas articulares (116). La mayoría de los pacientes con EPI asociada a AR (EPI-AR) presentan una enfermedad articular de larga evolución. Sin embargo, en 1 de cada 3 pacientes la EPI se presenta antes o cerca del diagnóstico de AR (115). Los mecanismos de desregulación de respuesta inmunitaria a los antígenos propios del pulmón parecen ser relevantes para la generación de autoinmunidad sistémica en la AR.

La EPI-AR es una complicación cada vez más reconocida, que afecta incluso desde etapas muy precoces de la enfermedad (117). La creciente investigación en este tema nos ha revelado varios de los factores de riesgo relacionada a esta manifestación extraarticular. Sin embargo, el conocimiento sobre la evaluación

óptima de la enfermedad, el tratamiento y el cribado de esta complicación es limitado.

3.1 Epidemiología y factores de riesgo

Se estima que la EPI afecta entre el 3-50% de los pacientes con AR (118). En un análisis transversal de una cohorte de pacientes con AR seleccionados aleatoriamente en 34 centros españoles (estudio EMECAR), la prevalencia de EPI fue de un 3.7% (IC95% 2.4 a 5.0) (119).

La incidencia de esta complicación parece ser constante con el paso de los años (120). Estudios de base poblacional sugieren que la incidencia acumulada de EPI definida por tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) sintomática, (con pruebas de función pulmonar (PFR) alterada) es del 5% a los 10 años (112) , 6.3% a los 15 años (121) y 6.8% al cabo de 30 años de seguimiento (120).

Aunque la AR predomina en el sexo femenino, la EPI-AR prevalece más en los hombres (9.8%) en comparación a las mujeres (6.8%) (122). Además del sexo masculino (114, 123, 124), existen otros factores de riesgo reconocidos para EPI en la población con AR. Las asociaciones más consistentes entre los estudios incluyen la edad avanzada (114, 121), la alta actividad de la AR (125), seropositividad para el FR o ACPA (126-128) y el tabaquismo (124, 126, 127).

A pesar de los datos presentados, la prevalencia e incidencia de EPI, así como sus factores de riesgo fluctúan entre las diferentes cohortes de AR estudiadas hasta el momento. La variabilidad parte es debida a las diferencias en los métodos de cribado, la población examinada y los criterios utilizados.

3.2 Etiopatogenia

El primer paso en la inducción de la EPI-AR implica la aparición de lesiones de las células epiteliales alveolares y de las vías respiratorias en sujetos genéticamente predispuestos (como el HLA – B54, HLA – DQ1B* 0601, HLA – B40 y el gen que

codifica el inhibidor de la proteasa α -1) (129). Estas lesiones aparecen como consecuencia del tabaquismo y la exposición a factores ambientales que causan oxidación, como una infección o la aspiración de saliva con *Porphyromonas gingivalis*. La lesión persistente o repetitiva de la mucosa de las vías respiratorias activa el sistema inmune innato y produce una respuesta inflamatoria.

En aquellos con predisposición genética, la tolerancia inmune falla y se desencadena una respuesta autoinmune, que resulta en la generación de anticuerpos asociados con la AR. En respuesta a estos anticuerpos, las células dendríticas orquestan la liberación de citocinas inflamatorias, que prevalece sobre los mecanismos de curación y homeostasis del tejido pulmonar, culminando en la transición epitelial a mesenquimal y la remodelación de las vías respiratorias, junto a la fibrosis (113, 130, 131).

Pero la historia natural de la EPI-AR nos hace considerar dos vías potenciales que vinculan la afectación articular y pulmonar. En la primera vía, la enfermedad comenzaría en el tejido sinovial después de una respuesta inmune contra proteínas modificadas que posteriormente reaccionan de forma cruzada con antígenos similares en el pulmón. La plausibilidad de esta hipótesis se deriva de la observación de que la mayoría de los pacientes con EPI-AR desarrollan enfermedad articular antes de la afectación pulmonar. En el segundo paradigma, la desregulación de la tolerancia inmune tiene lugar en el pulmón, y la EPI desencadena una respuesta inmune contra proteínas modificadas que se disemina secundariamente a las articulaciones. Esta hipótesis se respalda en que la EPI puede preceder, inclusive por varios años, los síntomas articulares, y la presencia de péptidos citrulinados en el parénquima pulmonar de pacientes fumadores y en sujetos en riesgo de desarrollar AR (30, 132).

3.3 Clasificación

Establecer si la EPI está realmente asociada con la AR, requiere de una evaluación exhaustiva para excluir causas alternativas, como infección respiratoria, efectos tóxicos del medicamento, exposición ambiental o lesión pulmonar inducida por aspiración entre otros.

No existe una taxonomía oficial propia para la EPI-AR. Pero se suele utilizar la clasificación oficial de la Sociedad Torácica Estadunidense y la Sociedad Respiratoria Europea para las neumonías intersticiales idiopáticas de 2011 (133). Según esta, las formas de EPI relacionada a las conectivopatías incluyen las siguientes:

- Neumonía intersticial usual
- Neumonía intersticial no específica
- Bronquiolitis respiratoria enfermedad pulmonar intersticial
- Neumonía intersticial aguda
- Neumonía intersticial descamativa
- Neumonía organizada criptogénica
- Neumonía intersticial linfocítica

La EPI en pacientes con AR a menudo suele ajustarse al patrón neumonía intersticial usual (NIU) en los estudios de imágenes y muestras de tejido (134). La discriminación entre los fenotipos NIU y no-NIU es muy importante, ya que existe grandes diferencias pronósticas entre ambos fenotipos.

La supervivencia de pacientes con AR con NIU es mucho menor (135, 136). Los pacientes con este patrón suelen experimentar un mayor número de hospitalizaciones relacionadas con problemas respiratorios y al requerimiento de oxigenoterapia (135).

Otro tema para considerar es el hecho de que la enfermedad pulmonar puede ser la forma de presentación de una enfermedad sistémica. Aproximadamente el

15% de las personas que sufren de fibrosis pulmonar idiopática (FPI), con el paso del tiempo, son diagnosticadas de una conectivopatía asociada (137). Para el subgrupo de pacientes que presentan afectación pulmonar junto con características clínicas o de laboratorio de una conectivopatía, pero insuficientes para clasificarlos, se han propuestos los siguientes términos: 1) conectivopatía indiferenciada (138), 2) conectivopatía dominante en pulmón (139), y 3) EPI con características autoinmunes (140).

Caracterizar los subgrupos de enfermedad pulmonar asociada a AR por endotipos implicaría la consideración de distintos mecanismos funcionales o fisiopatológicos relevantes para cada subgrupo, que en última instancia podría tener utilidad para dirigir la terapia y medidas preventivas o determinar el pronóstico como en la esclerosis sistémica. Donde la clasificación precisa de la enfermedad ha ayudado a llevar a cabo con éxito ensayos clínicos de tratamientos eficaces (141).

3.4 Similitud entre la NIU relacionada a la AR y la FPI

La NIU en pacientes con AR y la FPI comparten ciertos rasgos que abren el debate sobre si estas dos enfermedades presentan vías comunes de desarrollo. En realidad, estas dos entidades son prácticamente indistinguibles a nivel histológico o radiológico (ver Figura 3.1). Clasificaremos un patrón de fibrosis pulmonar de NIU-AR o FPI según nos enfrentamos a un paciente con AR o si la fibrosis no tiene una causa identificable.

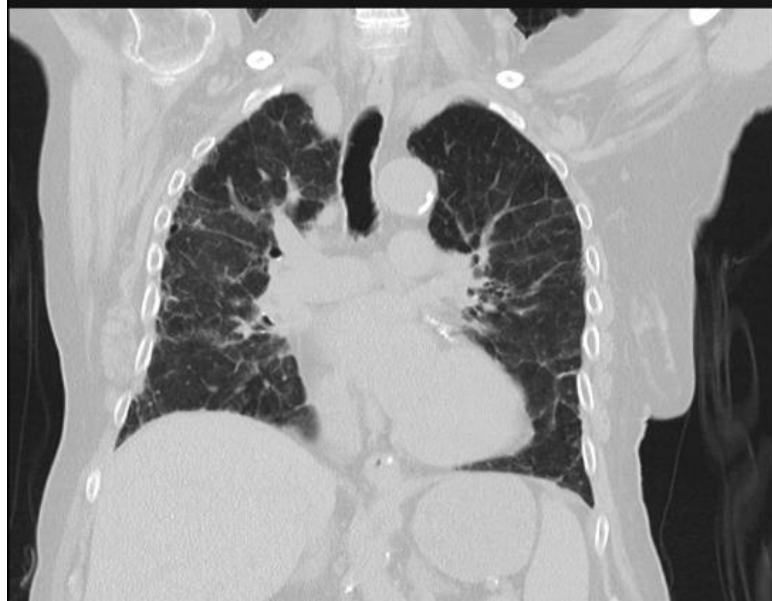


Figura 3.1 TACAR con patrón de Neumonía intersticial fibrosante con opacidades reticulares subpleurales y bronquiolectasias de distribución difusa sin claro predominio basal.

De forma interesante, se han reportado un aumento de proteínas citrulinadas en el pulmón de fumadores, pacientes con EPI-AR y pacientes con FPI en comparación con los controles sanos (30, 147, 148).

Similar a la AR, se pueden encontrar ACPA en suero en un subgrupo de pacientes con FPI (149). Curiosamente, los niveles de estos autoanticuerpos se correlacionan con peores desenlaces respiratorios (150, 151). Además, una parte de los pacientes FPI ACPA-positivo desarrollara AR (152). Todo ello sugiere una respuesta inmune adaptativa desregulada al menos en un subconjunto de las FPI y realza la idea de mecanismos de enfermedad superpuestos entre la FPI y la AR.

3.5 Manifestaciones clínicas, diagnóstico y cribado

Los síntomas de presentación más comunes son la tos no productiva y disnea de esfuerzo. Esta última puede enmascarse debido a la movilidad limitada por el dolor, en pacientes con artritis.

Los signos físicos de afectación respiratoria pueden ser mínimos o ausentes a pesar de la presencia de anormalidades radiográficas, pero la taquipnea y los crepitantes inspiratorios bibasales son signos comunes (153). También

encontramos roces pleurales y, en la enfermedad avanzada, puede aparecer cianosis, edema y signos de hipertensión pulmonar. Esta última, debe sospecharse en presencia de acropaquías o desaturación arterial inducida por el ejercicio desproporcionada al grado de la afectación pulmonar.

Las radiografías convencionales son imprecisas e insensibles para detectar fibrosis en el parénquima pulmonar. En un estudio que incluía pacientes asintomáticos respiratorios con AR temprana, la radiografía de tórax mostró EPI en el 6% de los pacientes, mientras la TACAR detectó fibrosis en el 33% (123). La frecuencia de los hallazgos no solo depende de la precisión del método de cribado sino también de la población estudiada. En un estudio de 84 pacientes con AR establecida, las anomalías en el TACAR fueron detectadas en 29% pacientes asintomáticos y 69% de los pacientes sintomáticos (154).

Las PFR pueden revelar un defecto ventilatorio restrictivo con disminución de la capacidad de difusión del pulmón para el monóxido de carbono (DLCO) incluso en ausencia de síntomas (123). La DLCO es altamente sensible para detectar la presencia de EPI, mientras que los volúmenes pulmonares son más útiles para evaluar la extensión de la enfermedad (155). Similar a la FPI, los cambios a lo largo del tiempo que se consideran clínicamente relevantes incluyen una disminución en la capacidad vital forzada de $\geq 10\%$ o una disminución en la DLCO de $\geq 15\%$ durante 6 - 12 meses (156).

Se han propuesto otras novedosas técnicas de imagen para el cribado de la EPI, como la tomografía por emisión de positrones (157) y la ecografía pulmonar (158) que podrían adquirir gran relevancia en el futuro.

Los biomarcadores séricos son otra línea de gran interés para el cribado de esta complicación. Los ACPA son considerados como el biomarcador más conocido de EPI-AR. En un metaanálisis reciente, la positividad de ACPA se asoció con un mayor riesgo de EPI (OR: 4.7, IC 95% 2.1–10.6) (159). Pero su sensibilidad y valor predictivo son bajos ya que la gran mayoría (67-90%) (159) de pacientes con AR

son positivos a dichos anticuerpos, por lo que su papel para cribado de esta complicación está en entredicho. Otros biomarcadores como las MMP-7, la proteína D tensioactiva y Krebsvon del Lungen-6 (128, 160) han adquirido gran interés de forma más reciente. No obstante, dichas pruebas aun requieren de validación externa para su uso universal.

A pesar de todas estas técnicas de cribado, la pericia del médico es probablemente la herramienta más importante para discriminar el riesgo de EPI entre los pacientes con AR. Un modelo basado en las características utilizadas en la práctica clínica, como la edad, el sexo, el tabaquismo, el FR y ACPA, tiene una potente capacidad de detección tanto de la EPI-AR sintomática y la subclínica (128).

3.6 Pronóstico

En comparación con la población general, la AR conlleva un riesgo 50% mayor de mortalidad (161). Las enfermedades cardiovasculares y neoplasias son las dos principales causas de muerte en esta población.

En las últimas décadas, las tasas de mortalidad relacionadas con estas enfermedades han disminuido (162, 163), posiblemente atribuidas a un diagnóstico más temprano y a la estrategia de tratamiento por objetivos. Por el contrario, las muertes por enfermedad pulmonar se han mantenido estables (163). Una mujer con AR seropositiva tienen un riesgo de morir debido a la enfermedad respiratoria 3 veces mayor en comparación con otra mujer de la misma edad sin AR (164). Considerando todo lo anterior, es posible que las muertes de causa pulmonar se conviertan en la principal causa de muerte en los pacientes con AR en un futuro.

La EPI-AR juega un papel importante en las muertes relacionadas con enfermedades pulmonares y constituye una necesidad no cubierta, incluso con las opciones de tratamiento disponibles. En una gran cohorte de pacientes con

AR del Reino Unido, la fibrosis pulmonar fue la causa principal de muerte o contribuyó como condición comórbida en el 7% de las defunciones (165). Además, debemos de tener en cuenta que la hipertensión pulmonar asociada a la EPI contribuye a la alta incidencia de muertes relacionadas con enfermedades cardiovasculares.

Entre los predictores de mortalidad en la EPI-AR, la edad avanzada es la variable de mal pronóstico más consistente. Otras variables asociadas con la mortalidad de la EPI-AR incluyen: el sexo masculino, la gravedad de la enfermedad según lo evaluado por las PFR, el grado de fibrosis en la TACAR, un patrón NIU, exacerbación aguda y actividad de la enfermedad de la AR (115, 121, 127, 166, 167) .

ANTICUERPOS ANTI-PROTEINAS CARBAMILADAS

Los anticuerpos representan una de las barreras fundamentales de la defensa inmune. Pero junto a los anticuerpos protectores, algunas personas también producen anticuerpos autorreactivos que pueden causar daño tisular. Dichos anticuerpos pueden dirigirse contra una serie de moléculas que normalmente están presentes en el organismo.

Como ejemplo, las modificaciones postraduccionales (PTM) de proteínas propias pueden conducir al no reconocimiento de estas como propias y resultar en la generación de autoanticuerpos.

Las PTM son mecanismos esenciales utilizados por las células eucariotas para diversificar sus funciones proteicas y coordinar dinámicamente sus redes de señalización. Además, las PTM influyen en casi todos los aspectos de la biología celular y en la patogénesis. Entre los procesos de modificación proteico se incluyen la carbamilación, la citrulinación, la acetilación, la fosforilación y la glicosilación (168).

En situación de homeostasis celular, estas modificaciones no son "visibles" para el sistema inmune. Sin embargo, es probable que se inicie una respuesta inmune contra aquellas proteínas que se saltan el proceso de selección negativa.

La selección negativa se refiere a la eliminación de aquellas PTMs reconocidas como extrañas y potencialmente perjudiciales. Por lo tanto, una proteína carbamilada o citrulinada en condiciones fisiológicas no iniciará una respuesta inmune, mientras que, cuando la misma modificación se presenta de manera aberrante al sistema inmune, puede inducir una respuesta inmune (32, 169).

De forma amplia, los anticuerpos que actúan frente a estas PTMs son conocidos como familia AMPA (por sus siglas en inglés; anti-modified protein antibodies).

Los AMPA han recibido una gran atención en las últimas décadas por su relación con varias enfermedades autoinmunes.

En este apartado nos centraremos en la carbamilación, así como en la respuesta inmune contra las proteínas carbamiladas, especialmente en el contexto de la AR.

4.1 El proceso de carbamilación

La carbamilación se define por la unión no enzimática de un resto "carbamilo" (-CO-NH₂) a grupos funcionales libres de proteínas, péptidos y aminoácidos libres. Esto se produce como resultado de la interacción entre un compuesto electrofílico (generalmente ácido isociánico) y un grupo funcional nucleofílico, la mayoría de las veces un grupo amino.

La reacción de la carbamilación tiene lugar preferentemente en los grupos α -amino de aminoácidos, péptidos o proteínas. Pero también sucede en los grupos ϵ -amino (a una velocidad 100 veces menor debido a su menor pKa) de cadenas laterales de residuos de lisina. En el segundo caso, la carbamilación conduce a la formación de una ϵ -carbamil-lisina, también llamada homocitrulina (170).

La vía más común que conduce a la formación de ácido isociánico es la disociación espontánea de urea en amoníaco y cianato en soluciones acuosas. La urea se disocia de manera reversible de acuerdo con un equilibrio que está principalmente a favor de la urea (fisiológicamente, la proporción es de 100: 1), pero como el subproducto formado (ácido isociánico) es altamente reactivo, se une inmediatamente a proteínas u otros sustratos, que mueve el equilibrio a la forma de disociación. A pesar de la baja concentración de cianato, se puede detectar una pequeña cantidad de carbamilación en personas sanas.

La urea es el subproducto final del metabolismo del nitrógeno en la especie humana y durante mucho tiempo se ha considerado solo una sustancia residual no reactiva. Sin embargo, su disociación en compuestos reactivos en el origen de las reacciones de carbamilación demuestra que ese no es el caso.

Las concentraciones de urea en sangre aumentan en pacientes con enfermedad renal crónica, así como las concentraciones de ácido isociánico, lo que explica que la intensidad de la reacción de carbamilación se mantenga en tales circunstancias (171). Una fuente alternativa de ácido isociánico se ha desvelado más recientemente. Un precursor del ácido isociánico es generado tras la acción enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) (83) sobre el tiocianato en presencia de peróxido de hidrógeno (172). El tiocianato es aportado por la dieta, especialmente por frutas y verduras, así como por los subproductos lácteos y por el humo. Se sabe que la MPO es una enzima abundante contenida en las células inflamatorias, como los neutrófilos polimorfonucleares y los monocitos / macrófagos, que transforma el tiocianato en ácido hipotiociánico y cianato. Debido a su localización preferencial en las paredes arteriales, su papel en la formación de ácido isociánico ha sido defendido principalmente en las placas ateroscleróticas (173). Un tercer mecanismo para el suministro de ácido isociánico o sus precursores al organismo, es la transportación de cianato por la respiración del aire, como resultado de la combustión de biomasa y el humo del tabaco (174). También se hipotetiza que el cianato puede ser aportado por nutrientes específicos como la raíz de la yuca (175).

A grandes rasgos, podemos decir que la carbamilación de bajo grado ocurre en condiciones fisiológicas a lo largo de toda la vida, pero su producción o acumulo excesivo pueden llevar a procesos patológicos. El impacto de la carbamilación en las propiedades de las proteínas es inmenso y les afecta en varios niveles.

4.2 Efectos fisiopatológicos de la carbamilación

De forma dosis dependiente la carbamilación genera cambios en la estructura y función de proteínas y pequeñas moléculas. Estas variaciones pueden interferir con las funciones celulares y desencadenar trastornos sistémicos. Por lo tanto, las consecuencias de la carbamilación ocurren a nivel proteico, celular y sistémico.

EFFECTOS DE LA CARBAMILACIÓN A NIVEL MOLECULAR Y PROTEICO

La carbamilación puede conducir a una disminución de la actividad de enzimas y hormonas, como en el caso de la ceruloplasmina, la apo-aspartato aminotransferasa, la MMP-2 y la insulina (176).

La carbamilación puede influir en una función de una determinada hormona, mientras que otras propiedades funcionales permanecen sin cambios. Por ejemplo, la eritropoyetina carbamilada pierde su función eritropoyética y angiogénica pero no su función protectora del tejido. Por lo tanto, la carbamilación de la eritropoyetina contribuye a la aparición de anemia en las personas con enfermedad renal (177).

También se puede alterar la afinidad de unión a los ligandos tras la carbamilación de la hemoglobina A y la albúmina sérica humana, observándose un aumento de afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, y una disminución de afinidad de la albumina a pequeñas moléculas ácidas.

Otros efectos moleculares descritos de la carbamilación en las proteínas incluyen el cambio de su capacidad de polimerización (colágeno, tubulina y actina), sensibilidad a las proteinasas (MMP y colagenasa), pérdida de la función antioxidante de aminoácidos, así como el aumento de avidéz de unión entre antígenos y anticuerpos (176).

EFFECTOS DE LA CARBAMILACIÓN A NIVEL CELULAR

La exposición a concentraciones relativamente altas de cianato es citotóxica. Por ejemplo, la incubación in vitro con cianato disminuye la síntesis proteica de las células de la médula ósea y la secreción de insulina de las células β pancreáticas. Igualmente, el isocianato reduce la tasa de respiración de las mitocondrias y la producción de especies de oxígeno reactivas de neutrófilos humanos (176, 178).

EFFECTOS DE LA CARBAMILACIÓN A NIVEL SISTÉMICO

Como consecuencia de los efectos sobre las proteínas y las funciones celulares, la carbamilación también puede desencadenar efectos sistémicos como la nefrotoxicidad y la hepatotoxicidad.

El cianato se ha utilizado para tratar a los pacientes con anemia de células falciformes. Pero la neurotoxicidad y la catarata se presentan como efectos secundarios de este tratamiento. Estas consecuencias también pueden ocurrir en pacientes con enfermedad renal crónica por acumulación de una concentración relativamente alta de cianato (179). La toxicidad parece estar inducida por la alteración del metabolismo anaerobio de la cisteína y el aumento del estrés oxidativo por aumento en la concentración del cianato.

4.3 Carbamilación en el envejecimiento y enfermedades

ENVEJECIMIENTO

Las proteínas carbamiladas se acumulan en los tejidos sobre todo en aquellas proteínas con una vida media larga, como las proteínas de la matriz, el colágeno tipo I y la elastina. Curiosamente, la tasa de acumulación de éstas se correlaciona inversamente con la longevidad (180). Este es el caso de las proteínas del cristalino que son propensas a esta reacción, que puede conducir al desarrollo de cataratas, una enfermedad relacionada con la edad. Por lo tanto, la carbamilación de proteínas puede considerarse un sello distintivo del envejecimiento en especies de mamíferos que pueden contribuir significativamente en los daños estructurales y funcionales del tejido encontrados durante el envejecimiento.

ENFERMEDADES RENALES CRÓNICAS

Los pacientes que padecen uremia tienen niveles aumentados de carbamilación en diferentes moléculas, incluyendo aminoácidos libres, hemoglobina A, lipoproteína de baja densidad (LDL), albúmina, proteínas plasmáticas, proteínas de la membrana eritrocitaria y proteínas renales (172, 177, 178).

El grado de carbamilación está relacionado con el grado de exposición a la urea y la adecuación de la diálisis en estos pacientes (181). Tanto así, que los niveles de proteínas carbamiladas se correlacionan con marcadores de la función renal. Este hecho, dificulta acreditar cual es el grado de contribución de la carbamilación a la disfunción renal. No obstante, el papel de la carbamilación como factor de riesgo independiente en la progresión del deterioro renal ha sido reflejado por dos hallazgos importantes; 1) el porcentaje de albumina carbamilada es el factor de riesgo más importante para predecir mortalidad en dos cohortes de enfermos con enfermedad renal en etapa terminal y 2) en un modelo animal de enfermedad renal la inyección de proteínas carbamiladas genero el almacenamiento de proteínas y la fibrosis peritubular renal (176).

En consecuencia, podemos decir que el grado de carbamilación parece ser un importante marcador pronóstico independiente en pacientes con enfermedad renal. Aun así, desconocemos cuales son los mecanismos involucrados en este proceso.

CATARATA

La catarata se informó por primera vez como un efecto secundario del tratamiento con cianato en pacientes con enfermedad de células falciformes (179). Diferentes estudios sobre modelos in vitro e in vivo sugieren una posible contribución de la carbamilación a la formación de cataratas. En 15 perros que recibieron cianato de sodio, 14 desarrollaron cataratas y 5 desarrollaron lesiones corneales. Asimismo, se han detectado restos carbamilados en el cristalino de pacientes con cataratas. La incubación de cristales cristalinos con cianato causa agregación al alterar sus estructuras terciarias y secundarias y aumenta la formación de enlaces disulfuro entre cadenas (182).

ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ATEROSCLEROSIS

La carbamilación también parece contribuir en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (ECV). Se han descrito niveles aumentados de carbamilación de

proteínas plasmáticas en pacientes con ECV aterosclerótica e insuficiencia cardíaca (169). Asimismo, el aumento de carbamilación se relaciona con la aparición de eventos clínicos adversos de estos pacientes (172, 183).

Varios estudios se han centraron en la relación entre la ECV con las lipoproteínas carbamiladas. Entre los hallazgos más relevantes tenemos, que el grado de carbamilación en las lipoproteínas de alta densidad (LDH) en las placas ateroscleróticas se correlaciona con la gravedad de las lesiones y el estrés oxidativo mediado por MPO. Asimismo, la carbamilación de la apolipoproteína A1 induce la acumulación de colesterol en los macrófagos (184). Además, la carbamilación del LDH disminuye su actividad antioxidante y la capacidad de transferir colesterol de las células al hígado (185).

TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

La carbamilación también ha sido implicada en enfermedades neurológicas. Estudios en ratas han demostrado una correlación positiva entre los déficits de memoria y los niveles de carbamilación en el cerebro de rata (186). En humanos, tales complicaciones neurológicas pueden observarse en poblaciones de África subsahariana que subsisten con productos alimenticios derivados de yuca (altamente cianogénica) insuficientemente procesada que contienen compuestos que son tóxicos para la mitocondria. Los signos de toxicidad a largo plazo incluyen una parálisis espástica distinta e irreversible, conocida como la enfermedad de Konzo, así como déficits cognitivos. Estos resultados insinúan que la carbamilación puede estar involucrada en la neuropatía desarrollada en pacientes urémicos (187).

A modo resumen, la formación de proteínas carbamiladas a menudo se refiere en contextos patológicos caracterizados por una exacerbación de la reacción de carbamilación, como la insuficiencia renal crónica, trastornos degenerativos o enfermedades inflamatorias crónicas como la AR (que comentaremos en la siguiente sección). Sin embargo, esta reacción también ocurre en condiciones

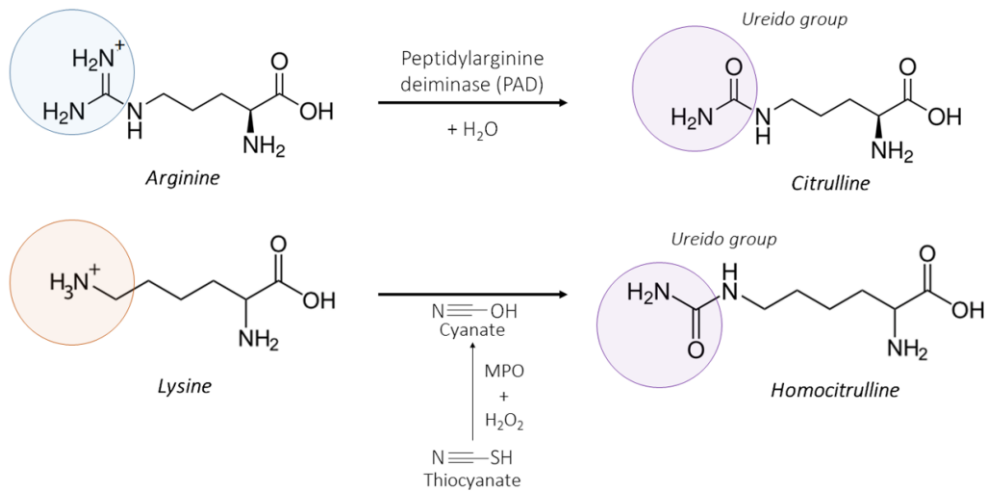
fisiológicas a un nivel basal que, aunque es menos importante, conduce a la acumulación de proteínas carbamiladas en el organismo durante el proceso de envejecimiento.

4.4 Anti-CarP en la artritis reumatoide

Las PTM tienen la capacidad de romper la tolerancia inmunológica e inducir respuestas en forma de autoanticuerpos. Los ACPA son el biomarcador más específico de la AR y dividen a los pacientes en 2 subconjuntos distintos (seropositivos versus seronegativos) que tienen diferentes cursos de enfermedad y de perfiles de riesgo genético y ambiental. Estos anticuerpos están presentes en alrededor del 60% de los pacientes con AR temprana, en el 70% de las poblaciones de AR establecidas y se relaciona con una enfermedad más grave y un peor pronóstico (188). No obstante, parte de los pacientes con AR ACPA negativo también tienen daño articular grave, por lo que existe la necesidad de biomarcadores adicionales para identificar a los pacientes que necesitan una intervención más intensa y precoz.

Dado que la homocitrulina tiene una alta similitud estructural con la citrulina (ver Figura 4.1), en 1984 Steinbrecher *et al.* introdujeron la noción de que la carbamilación era capaz de inducir una respuesta autoinmune (168). Estas observaciones fueron confirmadas en modelos animales, en donde se observó que la inmunización con péptidos que contienen homocitrulina generan quimiotaxis, activación de células T y producción de anticuerpos contra proteínas carbamiladas (anti-CarP) (189, 190).

Figura 4.1 Modificaciones postraduccionales de arginina y lisina que son epítomos en la artritis reumatoide



La arginina y la lisina son aminoácidos catiónicos a pH neutro. La adición de un grupo ureido (NH_2CONH) a la arginina y la lisina da lugar a los aminoácidos citrulina y homocitrulina no cargados, respectivamente. Las argininas que están presentes en los péptidos (peptidilarginina) son deiminadas por las enzimas peptidilarginina deiminadas. La lisina es carbamylada por el cianato, que puede surgir del efecto de la MPO y el peróxido de hidrógeno sobre el tiocianato. Imagen tomada de la referencia (191) (Rigby et al.)

En 2011 un equipo de investigación de Leiden (192), describe por primera vez la presencia de anti-CarP en suero de pacientes con AR. Se observó que los anti-CarP se unen a los antígenos carbamylados mediante los dominios F (ab) 2 de IgG. Los anti-CarP estaban presentes tanto en pacientes ACPA negativo (IgG: 16%, IgA: 30%) como en ACPA positivo (IgG: 73%, IgA: 51%). Además, estos anticuerpos se relacionan con una enfermedad más grave, especialmente en los pacientes ACPA negativos.

En aquel trabajo los autores utilizaron el suero de ternera fetal y el fibrinógeno carbamylados como antígenos para identificar anticuerpos anti-CarP (192). No obstante, se han identificado otras proteínas y péptidos carbamylados como epítomos para la generación de anticuerpos anti-CarP en la AR, como secuencias derivadas de la filagrina (189), colágeno (190), vimentina(193), albúmina (194) y α -enolasa (195).

Se desconoce el mecanismo molecular exacto de la patogénesis y el origen anatómico de estas proteínas homocitrulinadas. Los antígenos carbamilados identificados hasta ahora (filagrina, vimentina, albúmina, etc.) son proteínas que se producen naturalmente en el cuerpo humano. El papel de los neutrófilos en la AR ha suscitado interés ya que se ha sugerido la formación de trampas extracelulares de neutrófilos o NETs como el origen de los antígenos carbamilados en el líquido articular y pannus sinovial (196).

La MPO es una enzima que está presente en los gránulos de los neutrófilos y tiene una función clave en la defensa del huésped. La MPO utiliza iones con carga negativa (por ejemplo, cianato) para distorsionar las proteínas bacterianas y así inhibir su función. Cabe recordar que la adición de cianato a la cadena lateral de lisina crea homocitrulina. Se han encontrado MPO (en los gránulos de neutrófilos) y residuos carbamilados en sitios activos de inflamación en los tejidos sinoviales de pacientes con AR (197). También se ha descrito carbamilación de proteínas dependiente de especies reactivas de oxígeno, no relacionados con la NETosis (proceso por el que se producen las NETs) (198).

Por lo tanto, la presencia de altos niveles de proteínas homocitrulinadas y otras PTM en el organismo podría sobre estimular el sistema inmune del huésped mediante la inmunización repetida contra estos antígenos, hasta superar el punto crítico del sistema y desencadenar como consecuencia la autoinmunidad sistémica. Esta teoría se conoce como la auto-vacunación repetida, la cual explica el origen y propagación de autoanticuerpos (199). Sin embargo, la mera existencia de PTMs no es suficiente para inducir la formación de anticuerpos (200), por lo que se especula que también se necesita cierta predisposición genética.

La prevalencia de los anti-CarP circulantes en los pacientes con AR varía entre un 28% y un 80%. En comparación con los ACPA, estos anticuerpos tienen una menor sensibilidad y una especificidad similar. De hecho, en un metaanálisis reciente

que incluía 16 estudios, estima una sensibilidad y especificidad de los anti-CarP en pacientes con AR de un 43.1% y 94.4%, respectivamente (201). Esta variabilidad se explica en parte según el momento del curso de la enfermedad (AR temprana vs establecida), el método de laboratorio, los factores ambientales (tabaco) y los antecedentes genéticos (PTPN-22) (170, 193).

Se ha descrito un alto grado de reactividad cruzada de anticuerpos anti-CarP contra antígenos citrulinados. Sin embargo, hay pacientes anti-CarP positivos y ACPA negativos. Además, parte de los pacientes con ACPA / anti-CarP doble positivo albergan anticuerpos anti-CarP que no reaccionan de forma cruzada a las proteínas citrulinadas (192, 202). En general, los sueros de personas con AR doble positivo contienen anticuerpos ACPA y anti-CarP que se unen solo a proteínas citrulinadas o carbamiladas y también contienen anticuerpos que pueden unirse a ambas. En una pequeña cohorte de AR doble positivo, se encontró que el 70% (rango intercuartílico: 47%–87%) de los anti-CarP no reacciona de forma cruzada contra las proteínas citrulinadas (202).

A pesar de la reacción cruzada con otros anticuerpos, los anti-CarP han demostrado estar relacionados de forma independiente a peores desenlaces y complicaciones de la enfermedad. En el artículo original de Shi *et al.*, encontraron una asociación entre los anti-CarP y la enfermedad erosiva (192). Dicho hallazgo ha sido reproducido en otras cohortes (203, 204). Estos anticuerpos también se asocian significativamente con un mayor grado de discapacidad y una mayor actividad de la enfermedad, en especial en el subgrupo de pacientes ACPA negativos (205). Asimismo, aquellos pacientes positivos para los anti-CarP requieren de mayor uso de agentes biológicos en comparación a los anti-CarP negativos (206, 207).

Los anti-CarP se han relacionado a complicaciones frecuentes de la AR como el riesgo cardiovascular (208) o la osteoporosis (209). En un estudio prospectivo español de pacientes con AR, se evidenció un aumento de la mortalidad en los

individuos positivos para los anti-CarP, sobre todo en aquellas muertes de causas respiratorias (210).

Todo lo anterior refleja como los anti-CarP son capaces de identificar pacientes con peores desenlaces a largo plazo, especialmente en pacientes seronegativos para otros anticuerpos, por lo que podemos afirmar que proporcionan información adicional útil a los anticuerpos utilizados de forma rutinaria en la AR.

4.5 Anti-CarP en las fases preclínicas de la artritis reumatoide

Se han detectado anti-CarP en suero en diferentes grupos con alta probabilidad de desarrollar AR, como es el caso de las artralgias inflamatorias (211, 212) o familiares de primer grado de pacientes con AR (213). Estos anticuerpos pueden encontrarse incluso muchos años antes del inicio de los síntomas articulares. Estudios de muestras de biobanco han revelado presencia de anti-CarP hasta 14 años (media 7 años y rango intercuartílico 3-10 años) antes del diagnóstico de la AR (214). Por otra parte, hay aumento gradual en la frecuencia de positividad y en los niveles de los anti-CarP a medida que se acerca al momento del inicio de los síntomas, alcanzando su punto máximo tras el diagnóstico definitivo de la AR (215). El riesgo de desarrollo de la AR aumenta en un 56% en los sujetos con artralgias inflamatorias con anti-CarP de forma independiente a otros anticuerpos (211). Con estos hallazgos es tentador especular que dichos anticuerpos participan en la patogénesis de la AR.

El solapamiento de los anti-CarP con otros anticuerpos pone en entredicho su valor diagnóstico y predictivo en situaciones de riesgo de desarrollar AR. Un metaanálisis reciente intenta responder a esta cuestión. Los autores concluyen, que al añadir los anti-CarP al arsenal de biomarcadores utilizados en práctica clínica de rutina (FR y ACPA) resulta en una mayor especificidad y probabilidad de detectar aquellos individuos que desarrollaran AR, a expensas de una disminución en la sensibilidad. La relación costo-beneficio fue más favorable en

los sujetos que carecen de otros autoanticuerpos. La utilización de estos anticuerpos también reduce la posibilidad de clasificar erróneamente los controles no AR (216).

El fenotipo clínico de presentación de la AR varía según el número de anticuerpos (anti-CarP, FR, ACPA) presentes al debut de su enfermedad. En aquellos con mayor número de anticuerpos suelen ser más jóvenes, a menudo fumadores, con una mayor duración de los síntomas y mayores niveles de reactantes de fase aguda (217), reflejando que la amplitud de la respuesta autoinmune humoral puede repercutir en el fenotipo clínico inicial.

Aunque el papel de los anti-CarP en la clasificación de pacientes con AR es cuestionable, estos anticuerpos están envueltos en el desarrollo de la AR y tienen potencial para estratificar a las AR y los sujetos en riesgo de desarrollar AR, y así identificar aquellos que podrían beneficiarse de medidas preventivas o tratamiento más intensivos en las etapas tempranas.

4.6 Anti-CarP y otras enfermedades reumatológicas

El aumento de la carbamilación por sí solo no es suficiente para una ruptura de la tolerancia contra las proteínas carbamiladas. La insuficiencia renal, la enfermedad inflamatoria intestinal y el tabaquismo son condiciones donde está aumentada la concentración de cianato. A pesar de ello, no se ha detectado un aumento significativo de anti-CarP en comparación a la población sana (200). Posiblemente, el no aumento de anticuerpos dirigidos contra la homocitrulina en situaciones con altas concentraciones de cianato se debe a la ausencia de otros factores (genéticos o ambientales) necesarios para la inducción de anticuerpos.

Se han detectado anticuerpos contra proteínas homocitrulinadas en otras formas de artritis inflamatorias diferentes a la AR, como la artritis psoriásica (218) o la artritis idiopática juvenil (219). También se han identificado anti-CarP en otras enfermedades autoinmunes sistémicas como en el síndrome de Sjögren primario

(220), lupus eritematoso sistémico (221) y la esclerosis sistémica (222) . En comparación a la AR, la prevalencia de anti-CarP en estas enfermedades es mucho menor. Aun así, estos anticuerpos se relacionan con un mayor grado actividad de la enfermedad en cada una de estas enfermedades (220-222).

4.7 La familia AMPA

Arginina y lisina se distinguen como los aminoácidos más básicos (catiónicos). También son el objetivo de muchas modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la acetilación, citrulinación, hidroxilación, metilación y la ubiquitinación. Las PTMs permiten un amplio rango de funcionalidades por una sola proteína, incluyendo la regulación de la transcripción, reparación y replicación del ADN. Además de sus funciones en condiciones fisiológicas normales, algunas de estas modificaciones proteicas han sido reconocidas como desencadenantes inflamatorios y objetivos de reacciones autoinmunes.

De hecho, como ya mencionamos antes, las proteínas modificadas pueden ser reconocidas como antígenos extraños y generar anticuerpos dirigidos contra éstas. En forma amplia, a estos anticuerpos se les conoce como la familia AMPA (Anticuerpos contra proteínas modificadas) las cuales parecen ser un sello distintivo en la AR. A fecha de hoy, la citrulinación, la carbamilación y la acetilación son las modificaciones postraduccionales reconocidas con capacidad de promover la formación de anticuerpos en esta enfermedad. Estas tres modificaciones generan polipéptidos no estándar a partir de aminoácidos básicos. A pesar de la gran similitud estructural entre ellas, los mecanismos por los que se producen, y los factores genéticos y ambientales envueltos en su aparición difieren (ver Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Similitudes y Diferencias entre la Homocitrulina y la Citrulina

HOMOCITRULINA		CITRULINA	
SIMILITUDES			
Tanto la homocitrulina y la citrulina son aminoácidos no estándar que provienen de aminoácidos catiónicos (lisina y arginina, respectivamente).			
Semejanza estructural: Ambos se caracterizan por la presencia de un grupo ureido (-NH-CO-NH ₂); Se diferencian en la longitud de las cadenas laterales (homocitrulina es un metileno más largo).			
La formación de residuos de citrulina y homocitrulina puede incrementarse con la inflamación crónica y por el humo de tabaco. Aunque por mecanismos distintos.			
DIFERENCIAS			
<i>Procesos envueltos en su producción</i>			
Reacción química (cianato reacciona con la lisina)		Reacción enzimática (deiminación de arginina)	
<i>Factores genéticos</i>			
PTPN-22		Epítipo compartido	
<i>Factores ambientales relacionados</i>			
Situaciones de hiperuricemia como la insuficiencia renal		Infección por Porphyromonas gingivalis	

La citrulinación proteica (o deiminación) es la conversión enzimática de peptidil-arginina en peptidil-citrulina, mediada por la familia de las peptidil-arginina deaminasas. La pérdida de una carga de la lisina al reaccionar con el cianato da lugar a la generación de homocitrulina. Curiosamente, la homocitrulina es estructuralmente muy similar a la citrulina, solo difieren en un único grupo metilo, a pesar de que provienen de diferentes aminoácidos. Como en la homocitrulinación, la lisina es también el aminoácido objeto de la acetilación. Las

especies reactivas producidas en situación de estrés oxidativo exagerado (inflamación o el alcohol) desencadenan la peroxidación de los lípidos de la membrana mediada por las acetiltransferasas intracelulares, lo que resulta en la formación de acetaldehído entre otros. Este último, modifica fácilmente los péptidos, con preferencia por los residuos de lisina, lo que resulta en la formación de aductos estables en proteínas que contienen malondialdehído acetaldehído (223).

Desde mediados del siglo XX, conocemos de la existencia de autoanticuerpos circulando en la sangre de los pacientes con AR (224). Pero no es hasta 1998 cuando se describe a la citrulina como el componente esencial para los determinantes antigénicos para uno de los anticuerpos específicos esta enfermedad, los ACPA (225). Con el descubrimiento de éstos se han logrado avances significativos en la atención clínica y la comprensión de los mecanismos de la enfermedad. Trece años después de la descripción de los ACPA, se identificó la carbamilación como una segunda modificación postraduccional capaz de generar anticuerpos (los anti-CarP) en la AR (192). En 2015, Thiele *et al.* reportaron la existencia de anticuerpos contra proteínas acetiladas (anti-APA) (226), proporcionando evidencia de una tercera PTM con potencial importancia clínica y mecanicista en la AR.

Los ACPA son el sistema de anticuerpos predominante en la AR, estos están presentes entre el 60-75% de los pacientes (188), mientras que los anti-CarP y los anti-APA en un 45% y 40% de los pacientes respectivamente (192, 227). Estos dos últimos sistemas se correlacionan con la seropositividad de ACPA y las 3 clases de anticuerpos suelen concurrir en un paciente con AR. Sin embargo, son considerados como familias independientes, dado a que se dirigen a diferentes antígenos y que presentan una reacción cruzada limitada en estudios de inhibición (202, 227). Cualquiera de estos anticuerpos puede encontrarse en otra enfermedad reumática, pero la presencia simultánea de los tres anticuerpos es

casi anecdótica. Por este motivo, el solapamiento entre las 3 familias de anticuerpos se considera como propio de la AR.

Recientemente un equipo de investigación del Reino Unido demostró en un modelo animal que la exposición de una proteína purificada que lleva una PTM definida puede generar anticuerpos de reacción cruzada hacia diferentes PTM (228). Posteriormente el mismo equipo evidenció que incluso un AMPA altamente específico para un antígeno en concreto es capaz de reconocer diferentes clases de antígenos de PTM (229). De forma más sencilla, podemos decir que las células B reactivas a proteínas citrulinadas no solo se activan con antígenos citrulinados, sino también con antígenos carbamilados y / o acetilados. Lo anterior indica que el patrón de reconocimiento no se limita a un tipo de modificación y demuestra una naturaleza de reacción cruzada entre AMPAs. Estos datos son vitales para comprender la rotura de la tolerancia de las células B contra los antígenos y la posible contribución de estos antígenos a la patogénesis de la AR.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Es probable que existan factores pronósticos relacionados con los anti-CarP aún no establecidos que podrían tener relevancia para la población con artritis reumatoide y reumatismo palindrómico.

1. Se desconoce si la población con RP presenta un AMPA distinto a los ACPA. Es posible que un subgrupo de pacientes con RP presente anti-CarP en suero. No obstante, como sucede con los ACPA, la respuesta inmune a estos antígenos carbamylados estaría más restringida que en la AR.
2. Los anti-CarP se asocian a un mayor grado de actividad de la enfermedad y un peor pronóstico en pacientes con AR. Pero la relación entre los anti-CarP y las manifestaciones extraarticulares, especialmente en aquellas con una alta morbimortalidad tal como la EPI-AR, no han sido examinadas aún. Similar a como ocurre con otros anticuerpos, los anti-CarP serán más prevalentes en aquellos pacientes con EPI-AR, por lo que podría utilizarse como biomarcador para esta grave complicación.
3. Dado la similitud estructural entre los ACPA y los anti-CarP, es probable que la seropositividad de anti-CarP sea un biomarcador de buena respuesta a abatacept en los pacientes con AR, al igual como sucede con los ACPA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivos genéricos

- Determinar la presencia y características de los anticuerpos anti-CarP en el RP.
- Establecer en pacientes con AR establecida la asociación entre anti-CarP y manifestaciones extraarticulares y respuesta terapéutica a abatacept.

Objetivos concretos

1. Analizar la prevalencia de anti-CarP en pacientes con RP y comparar su respuesta inmune contra proteínas carbamiladas frente a la de la AR establecida.
2. Analizar la relación entre los anti-CarP y la enfermedad pulmonar intersticial en pacientes con AR.
3. Determinar el papel de los anti-CarP como biomarcador de respuesta terapéutica a abatacept en pacientes con AR.

INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral son los siguientes:

PRIMER TRABAJO

TÍTULO: Anti-carbamylated protein antibody isotype pattern differs between palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis.

REVISTA: Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease 2020;12

SEGUNDO TRABAJO

TÍTULO: Rheumatoid Arthritis initiating as Palindromic Rheumatism: A Distinct Clinical Phenotype?

REVISTA: The Journal of Rheumatology 2020; 1;47.

TERCER TRABAJO

TÍTULO: Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease.

REVISTA: Annals of Rheumatic Disease. 2020;79.

CUARTO TRABAJO

TÍTULO: Anti-carbamylated protein antibodies are associated with early abatacept response in rheumatoid arthritis.

REVISTA: Clinical and Experimental Rheumatology. 2021.

A continuación, se presentan los trabajos incluidos, junto con sus objetivos, un resumen de los resultados y sus principales conclusiones

PRIMER TRABAJO

Anti-carbamylated protein antibody isotype pattern differs between palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis

Raul Castellanos-Moreira, Sebastian C Rodriguez-Garcia, Sonia Cabrera-Villalba, María José Gomara, Georgina Salvador, Virginia Ruiz-Esquide, Julio Ramirez, Jose Inciarte-Mundo, Rosa Morla, Cristina Garcia-Moreno, Andrea Cuervo, Jose A Gómez-Puerta, Juan D. Cañete, Isabel Haro, Raimon Sanmarti



Anti-carbamylated protein antibody isotype pattern differs between palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis

Raul Castellanos-Moreira¹, Sebastian C. Rodriguez-Garcia, Sonia Cabrera-Villalba, María José Gomara, Georgina Salvador, Virginia Ruiz-Esquide, Julio Ramirez², Jose Inciarte-Mundo, Rosa Morla, Cristina Garcia-Moreno, Andrea Cuervo, Jose A. Gómez-Puerta, Juan D. Cañete, Isabel Haro and Raimon Sanmarti¹

Ther Adv Musculoskel Dis
2020, Vol. 12: 1–10
DOI: 10.1177/
1759720X20978139
© The Author(s), 2020.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Abstract

Background: A restricted response against citrullinated peptides/proteins, with less isotype usage, has been found in palindromic rheumatism (PR) in comparison with rheumatoid arthritis (RA). We hypothesized that this different antibody response may be observed for other post-translational modified proteins. We compared the prevalence and isotype usage of two specificities of anti-carbamylated peptide/protein antibodies (Anti-CarP) in patients with PR and RA.

Methods: Cross-sectional study including 54 patients with pure PR and 53 patients with RA, matched by sex, age, disease duration and ACPA. Anti-CarP specificities were determined by home-made enzyme-linked immunosorbent assay tests using a synthetic chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide (CFFHP) and fetal calf serum (FCS) homocitrullinated protein as antigens. IgG, IgA and IgM isotypes were measured.

Results: Anti-CarP were positive (CFFHP or FCS) in 24% and 64% of patients with PR and RA, respectively ($p < 0.005$). All Anti-CarP isotype proportions were significantly lower in PR than in RA: Anti-CarP-IgG (24% versus 51%), Anti-CarP-IgA (7% versus 34%) and Anti-CarP-IgM (7% versus 36%). Mean titers of Anti-CarP isotypes were also lower in PR. In Anti-CarP positive patients, the isotype distribution differed between PR and RA: IgG Anti-CarP was used in all PR patients and in 79% of RA patients. By contrast, a significantly lower isotype usage of both IgA (31% versus 53%) and IgM (31% versus 56%) was observed in PR patients. No significant differences in clinical or demographic characteristics were observed according to Anti-CarP status in PR patients, except for a higher prevalence of ACPA and higher mean titers of ACPA and rheumatoid factor in Anti-CarP positive patients.

Conclusion: Anti-CarP are found in patients with PR but in a lower proportion and with a different isotype usage from in RA, suggesting a distinct B cell response to homocitrullinated antigens in PR.

Keywords: ACPA, Anti-CarP, autoantibodies, B cells, palindromic rheumatism, rheumatoid arthritis

Received: 1 July 2020; revised manuscript accepted: 3 November 2020.

Introduction

Palindromic rheumatism (PR) is an intermittent form of arthritis/peri-arthritis which may progress to persistent polyarthritis, mainly rheumatoid arthritis (RA).^{1,2} PR patients may have the characteristic autoantibody profile seen in RA: positive

rheumatoid factor (RF) and/or positive anticitrullinated peptide/protein antibodies (ACPA).^{3–6} ACPA are a biomarker for progression to RA in patients with PR,⁴ although a subset of ACPA-positive PR patients do not evolve to RA in the long term.⁷ The ACPA repertoire of PR patients differs from

Correspondence to:
Raimon Sanmarti
Arthritis Unit,
Rheumatology
Department, Hospital
Clinic of Barcelona,
Villarroel 170, Barcelona,
08036, Spain
sanmarti@clinic.cat

Raul Castellanos-Moreira
Sebastian C. Rodriguez-Garcia
Sonia Cabrera-Villalba
Virginia Ruiz-Esquide
Julio Ramirez
José Inciarte-Mundo
Rosa Morla
Andrea Cuervo
José A. Gómez-Puerta
Juan D. Cañete
Arthritis Unit,
Rheumatology
Department, Hospital
Clinic of Barcelona,
Barcelona, Spain

María José Gomara
Cristina Garcia-Moreno
Isabel Haro
Unit of Synthesis
and Biomedical
Applications of Peptides,
Institute of Advanced
Chemistry of Catalonia,
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
(IQAC-CSIC), Barcelona,
Spain

Georgina Salvador
Rheumatology
Department, University
Hospital Mutua Tarrasa,
Barcelona, Spain



that observed in RA, with fewer fine ACPA specificities and less isotype usage, suggesting that some PR patients have a distinct B cell response to citrullinated antigens that may preclude evolution to persistent RA.⁸

To our knowledge, ACPA are the only anti-modified protein antibody (AMPA) type that has been analyzed in PR. Anti-carbamylated protein/peptide antibodies (Anti-CarP) are a different AMPA that recognize homocitrullinated antigens and have emerged as a new antibody family frequently found in the sera of RA patients, with a specificity close to that of ACPA but with a lower sensitivity.⁹ Anti-CarP have been associated with radiographic damage in RA, especially in ACPA-negative patients,^{9,10} may predict RA progression in patients with inflammatory arthralgia¹¹ and have recently been associated with RA-associated interstitial lung disease.¹²

The aim of this study was to analyze the prevalence of two Anti-CarP specificities in PR patients and evaluate their isotype usage antibodies with that of patients with established RA. We hypothesized that the Anti-CarP response in PR may be more restricted than in RA, as occurs with the ACPA response.

Patients and methods

Study design and population

We made a cross-sectional study in patients with pure PR (not associated with any rheumatic disease at serum measurement) fulfilling the PR criteria described by Guerne and Weissman¹³ attending our outpatient clinic. All PR patients were treated according to the criteria of the treating physician. Patients fulfilling diagnostic criteria for other forms of inflammatory arthritis were excluded. Information on the current clinical, serological and treatment features at study entry were used for the analysis. Further details of this cohort are described elsewhere.^{8,14} Patients with established RA (1987 American College of Rheumatology criteria) matched by age, sex, ACPA positivity and disease duration were included as a control group.

Autoantibody assessment

Serum samples were collected at inclusion for autoantibody assessment. Two types of Anti-CarP were analyzed in sera from PR and RA patients: anti-chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide

(Anti-CFFHP) and anti-carbamylated fetal calf serum (Anti-FCS) fine specificities were determined by home-made enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests using a synthetic homocitrullinated peptide or carbamylated fetal calf serum as antigens and the non-homocitrullinated versions as the control peptide/protein for the homocitrulline specificity of Anti-CFFHP and Anti-FCS.

Chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide (CFFHP): [HCit^{620,625}] α-fibrin(617–631)-S³⁰⁶, S³¹⁹ cyclo [Cys^{306,319}, HCit³¹²]filaggrin (304–324) and its non-homocitrullinated version were synthesized by solid-phase peptide synthesis as C-terminal carboxamides on a Novasyn TGR resin (Novabiochem Merck, Germany) following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl strategy with subsequent cyclization in solution by forming a disulfide bridge as previously described for other chimeric citrullinated peptides.^{15,16}

To determine Anti-CFFHP, home-made ELISA assays were used. First, CFFHP and non-homocitrullinated peptide as a control for homocitrulline specificity were coupled covalently to microplates (Nunc Immobilizer) diluted to 10 µg/mL in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer. 100 µL of peptide solution was added to each microplate well and incubated overnight at 4°C. Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample and the peptide to estimate the background reading. After incubation, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer for 1 h at room temperature. Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% vol/vol Triton X-100, 0.5% wt/vol Na-deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 10% fetal bovine serum; 100 µL/well was added and incubated for 1.5 h at room temperature. IgG, IgA and IgM were detected using peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG, rabbit anti-human serum IgA and rabbit anti-human IgM (Fc5µ fragment specific) (Jackson ImmunoResearch Europe, UK), respectively, and SIGMAFAST with o-phenylenediamine dihydrochloride as substrate.

To detect Anti-FCS, an ELISA assay using both carbamylated and non-modified FCS as antigens were developed. FCS was carbamylated by incubating a 4 mg/mL concentration with 1 M of KCNO (or with 1 M of KCl for the controls) for 15 h at 37°C. After incubation, the samples were desalted by centrifugation (Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter units, Merck). Carbamylation

efficiency was assessed by amino acid analysis of the hydrolyzed samples in a Biochrom 30 amino acid analyzer (Biokrom, UK) using L-Norleucine as the internal standard. The conversion of Lys to homocitrulline was determined as the fraction of the total amount of amino acids.

Anti-FCS was determined by ELISA. All samples were assayed in separate plates (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Denmark) coated with FCS carbamylated and non-modified as antigens overnight at a concentration of 10 µg/mL of carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M pH 9.6). The plates were blocked with 1% BSA in PBS-0.05% Tween for 6 h at 4°C and, after washing the plates, diluted serum samples (1:50 in PBS-1% BSA-0.05% Tween) were incubated overnight at 4°C. IgG, IgA and IgM antibodies were detected using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG or rabbit anti-human serum IgA (α chain specific) or rabbit anti-human IgM (Fc5µ fragment specific) (Jackson ImmunoResearch Europe, UK), respectively and SIGMAFAST *p*-nitrophenyl phosphate as substrate.

Reactivity to non-homocitrullinated FCS and CFFHP peptide was subtracted from the reactivity to homocitrullinated FCS and CFFHP. Successive dilutions of a pool of sera from four positive patients were used as a reference standard in all plates and to convert optical density (OD) values to arbitrary units (AUs).

A positive cut-off value was defined as >342.5 AU/mL, >354.0 AU/mL, and >210.5 AU/ml for Anti-FCS-IgG, Anti-FCS-IgA, and Anti-FCS-IgM, respectively, and >115.5 AU/mL, >218.0 AU/mL, >354.0 AU/mL for Anti-CFFHP-IgG, Anti-CFFHP-IgA, and Anti-CFFHP-IgM, respectively. A test was only considered positive and specific for homocitrulline when UA/mL values were higher than the respective cut-off and the difference in OD values between carbamylated (homocitrullinated) and native (non-homocitrullinated) antigens was ≥0.1.

Serum levels of ACPA were measured using a CCP2 commercial test [ELISA; Immunoscans, Eurodiagnostica; cut-off >50 international units (IUs)] and RF by nephelometry (BNII, Siemens; cut-off >20 IU).

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the

Hospital Clinic of Barcelona Research Ethics Committee (approval number 2017/0679). Signed informed consent was obtained from all patients before study enrollment.

Statistical analysis

Between-group differences were analyzed using descriptive statistics as appropriate. Proportions were compared using the χ² or Fisher's exact test. Continuous variables were analyzed using the Wilcoxon signed rank test or the Mann-Whitney *U* test and presented as mean and standard deviation (±) or median and interquartile range. Statistical significance was established as two-tailed *p*-values <0.05 in all analyses, which were performed using IBM® SPSS® for Windows version 23.0. Missing data was handled with listwise deletion.

Results

Fifty-four PR patients and 54 RA patients were originally included in the study. Serum from one RA patient was not available for Anti-CarP measurement. Therefore, this patient was excluded from the final analysis. Baseline information on sex, age, disease duration, ACPA and RF positivity of PR and RA patients is presented in Table 1. No between-group differences were found for any of these variables.

Anti-CarP in PR

Anti-CarP (FCS or CFFHP) were observed in 13 PR patients (24%). ACPA and Anti-CarP overlap was observed in 12 patients (92% in Anti-CarP positive patients) Figure 1(a). No significant differences were observed in demographic data and clinical or therapeutic findings according to Anti-CarP status in PR patients. However, a significantly higher proportion of ACPA positivity and titers was observed in Anti-CarP PR positive patients. RF titers were higher in these patients (Table 2).

In PR patients, IgG was the predominant isotype: all 13 Anti-CarP positive patients used the IgG isotype. Anti-FCS-IgG and Anti-CFFHP-IgG were observed in 19% and 17%, respectively, of PR patients [six patients (11%) yielded positive results for both tests]. Anti-CarP-IgA and Anti-CarP-IgM were each found in only four patients (7%) [Table 3 and Figure 1(c)].

Thirteen PR patients were triple negative (negative Anti-CarP, ACPA and RF). No significant

Table 1. Study population baseline clinical and serological features.

	PR n=54	RA n=53	p value
Female, n (%)	34 (63%)	34 (64%)	NS
Age, mean years (±SD)	51.2 (±9.3)	54.5 (±11.2)	NS
Disease duration, mean years (±SD)	11.6 (±10.7)	8.4 (±6.1)	NS
Positive rheumatoid factor, n (%)	31 (57)	(57)	NS
Rheumatoid factor, mean titer [95% CI]	96 [42–151]	221 [66–377]	NS ^{a,b}
Positive ACPA, n (%)	36 (67%)	36 (68%)	NS
ACPA, mean titer [95% CI]	354 [219–489]	496 [335–658]	NS ^{a,b}

^aIncluding negative and positive patients.

^bNo difference when analyzing only positive patients (data not shown).

ACPA, anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies; CI, confidence interval; n, number; NS, not significant; PR, palindromic rheumatism; RA, rheumatoid arthritis; SD, standard deviation.

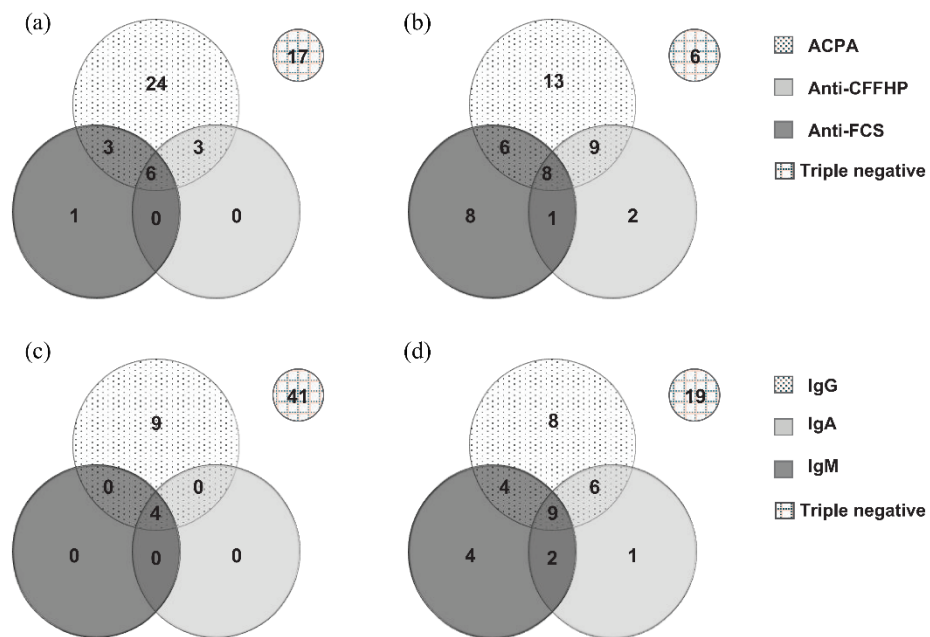


Figure 1. Antibodies overlap in palindromic rheumatism (PR) and rheumatoid arthritis (RA). (a) PR patients, overlap between Anti-FCS, Anti-CFFHP and ACPA; (b) RA patients, overlap between Anti-FCS, Anti-CFFHP and ACPA; (c) PR patients, Anti-CarP (Anti-FCS and Anti-CFFHP) isotypes overlap; and (d) RA patients, Anti-CarP (Anti-FCS and Anti-CFFHP) isotypes overlap. ACPA, anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies; Anti-CFFHP, anti-chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide antibodies; Anti-FCS, anti-carbamylated fetal calf serum antibodies; Ig, immunoglobulin.

differences in clinical and demographic data were observed when comparing triple negative *versus* Anti-CarP positive patients, or when comparing triple negative *versus* ACPA positive

patients (with or without Anti-CarP; *n* = 36) except for a shorter flare duration (<72 h) (69% *versus* 94%; *p* = 0.036) in the latter group (data not shown).

Table 2. Demographic, clinical, serological and therapeutic features in patients with palindromic rheumatism according to Anti-CarP status.

	Anti-CarP positive <i>n</i> = 13	Anti-CarP negative <i>n</i> = 41	<i>p</i> value
Female, <i>n</i> (%)	7 (54%)	27 (66%)	NS
Age, mean years (±SD)	50.0 (±9.3)	52.2 (±11.9)	NS
PR onset age, mean years (±SD)	40.9 (±8.9)	39.5 (±11.7)	NS
Disease duration since PR symptom onset, mean years (±SD)	9.0 (±6.9.4)	12.8 (±11.2)	NS
Ever smokers, <i>n</i> (%)	8 (62%)	26 (63%)	NS
Current smokers, <i>n</i> (%)	6 (46%)	11 (27%)	NS
Smoking cumulative dose ±SD	15.8 ± 7.8	19.0 ± 17.9	NS
Positive rheumatoid factor, <i>n</i> (%)	10 (77%)	21 (5%)	NS
Rheumatoid factor, mean titer (95% CI)	239 [76–443]	51 [34–74]	0.012
Positive ACPA, <i>n</i> (%)	12 (92%)	24 (59%)	0.04
ACPA, mean titer (95% CI)	781 [418–1183]	219 [124–339]	<0.005
Frequency (periodicity) of PR flares			
1 month	3 (23%)	3 (7%)	NS
≥1 week	3 (23%)	8 (20%)	NS
PR flares duration			
≤72 h, <i>n</i> (%)	12 (92%)	35 (85%)	NS
72 h ≤168 h, <i>n</i> (%)	1 (8%)	6 (15%)	NS
DMARDs			
HCO, <i>n</i> (%)	5 (39%)	15 (37%)	NS
MTX, <i>n</i> (%)	1 (8%)	5 (12%)	NS
DMARDs, not including HCO, <i>n</i> (%)	4 (31%)	9 (22%)	NS
GC, <i>n</i> (%)	2 (15%)	6 (15%)	NS

ACPA, anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies; Anti-CarP, anti-carbamylated protein/peptide antibodies; CI, confidence interval; DMARD, disease-modifying anti-rheumatic drug; GC, glucocorticoid; HCO, hydroxychloroquine; h, hours; MTX, methotrexate; *n*, number; NS, not significant; PR, palindromic rheumatism; SD, standard deviation.

Anti-CarP in RA

In the RA group (*n* = 53), Anti-CarP specificities were found in 34 patients (64%). ACPA and Anti-CarP overlap was observed in 23 patients (68% of Anti-CarP positive RA patients) [Figure 1(b)]. IgG was the predominant isotype in the RA group, found in 79% of patients positive for Anti-CarP. Anti-FCS-IgG and Anti-CFFHP-IgG were found in 36% and 21%, respectively, of RA

patients [three patients (6%) were positive for both tests]. IgA and IgM Anti-CarP isotypes were found in 34% and 36%, respectively [Table 3 and Figure 1(d)].

Anti-CarP between-group comparison

Positivity for Anti-CarP was significantly lower in PR patients (24% versus 64%; *p* < 0.005). All

Table 3. Anti-CarP specificities in palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis patients.

		Anti-FCS			Anti-CFFHP			Any specificity		
		PR n (%)	RA n (%)	p value	PR n (%)	RA n (%)	p value	PR n (%)	RA n (%)	p value
Positive	IgG	10 (19)	19 (36)	0.044	9 (17)	11 (21)	0.588	13 (24)	27 (51)	0.004
	IgA	4 (7)	10 (19)	0.093	1 (2)	10 (19)	0.004	4 (7)	18 (34)	0.001
	IgM	4 (7)	13 (25)	0.018	0 (0)	8 (15)	0.003	4 (7)	19 (36)	0.000
	Any isotype	10 (19)	23 (43)	0.005	9 (17)	20 (38)	0.014	13 (24)	34 (64)	0.001

Anti-CarP, anti-carbamylated protein/peptide antibodies; Anti-CFFHP, anti-chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide antibodies; Anti-FCS, anti-carbamylated fetal calf serum antibodies; Ig, immunoglobulin; n, number; PR, palindromic rheumatism; RA, rheumatoid arthritis.

isotype proportions were numerically higher in RA patients. Significant differences were found for Anti-FCS-IgG, Anti-FCS-IgM, Anti-CFFHP-IgA and Anti-CFFHP-IgM (Table 3). In addition, PR patients had a lower mean number of positive Anti-CarP specificities (0.52 versus 1.34, $p < 0.005$). Triple positivity (Anti-CarP, ACPA and RF) was more frequent in RA patients (36% versus 19%; $p = 0.044$).

All Anti-CarP isotype mean titers were higher in RA, with mean levels ranging from 1.3- to 5-fold-higher, although the differences were significant only for the Anti-FCS-IgG, Anti-FCS-IgA and Anti-CFFHP-IgM isotypes ($p < 0.05$ for all comparisons). A trend to significance was observed for Anti-FCS-IgM and Anti-CFFHP-IgA (Figure 2). However, when analyzing only Anti-CarP positive patients, there was no significant between-group (PR Anti-CarP positive versus RA Anti-CarP positive) difference for either specificity titer.

Discussion

Our results show, for the first time, the presence of Anti-CarP, an AMPA different from ACPA, in patients with pure PR. Anti-CarP isotype usage pattern in PR differed from that observed in RA, with a smaller proportion and lower titers in all specificities and isotypes in PR.

Two antigens were chosen to ensure the veracity of the results. First, FCS are by far the most widely-described antigen to test Anti-CarP.^{9,10,17} Second, CFFHP¹² is the homocitrullinated version of a chimeric citrullinated peptide bearing fibrin and filaggrin domains developed by our group. This antigen has been studied in a large series of patients with various rheumatic conditions, together with healthy

controls, and has demonstrated the presence of different peptide sequences within the same molecule rendered synergistic effects compared with monomeric peptides.^{15,18,19} As in a previous study,¹² Anti-FCS and Anti-CFFHP behaved similarly.

We found Anti-CarP in over half of RA patients. IgG was the most prevalent isotype (range 21–36%, according to the specificity), in agreement with that reported in patients with established RA.^{9,20} Anti-CarP were found in only 24% of PR patients. As in RA,²¹ Anti-CarP were clearly associated with ACPA positivity, even though there was a greater overlap between the two antibodies in PR patients than in RA. Inhibition studies have demonstrated that the overlap between antibodies is not simply due to the remarkably similar chemical structure in the antigenic targets of Anti-CarP and ACPA.²² However, even a highly specific ACPA monoclonal antibody can cross-react toward various post translational modifications (citrulline, homocitrulline and acetylde).^{23,24} Likewise, immunization with a specific antigen can generate different AMPA.²⁵ An individual patient may have various AMPA clones with distinct reactivity profiles capable of recognizing multiple amino acid motifs, rather than specific proteins.^{23–25} It might be speculated that PR AMPA clones have a narrowed amino acid motif recognition profile, ensuing a lower cross reactivity.

Besides the association with other autoantibodies, no differences in demographic, clinical or therapeutic characteristics were observed according to Anti-CarP status in PR. The relapsing–remitting nature of palindromic flares resembles the clinical picture of an autoinflammatory disorder,² and a subgroup of PR patients (mostly ACPA negative) have *MEFV* mutations, suggesting innate immune

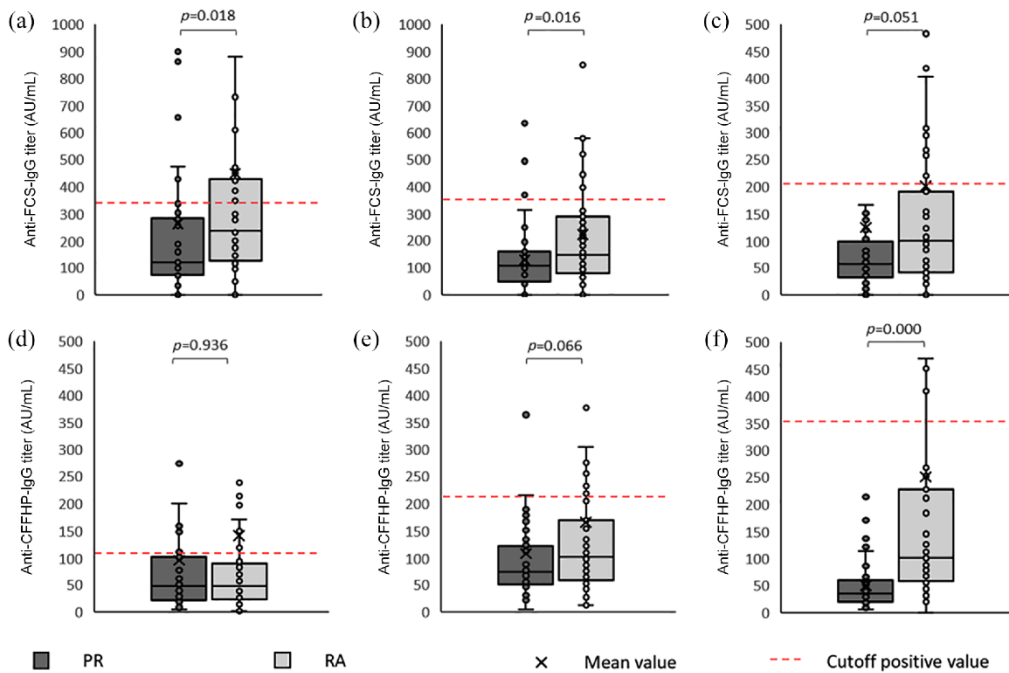


Figure 2. Anti-CarP titers in palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis. Anti-CarP, anti-carbamylated protein/peptide antibodies; Anti-FCS, anti-carbamylated fetal calf serum antibodies; Anti-CFFHP, anti-chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide antibodies; AU, arbitrary unit; Ig, immunoglobulin; mL, milliliter.

activation in PR.²⁶ Nonetheless, the presence of autoantibodies supports the hypothesis that the adaptative immune system is activated in most PR patients.

In established RA, a broad spectrum of Anti-CarP isotypes (IgG, IgM and IgA) have been documented, as in our cohort.²¹ The isotype distribution is quite different in PR, where IgG clearly predominates, and few patients used the IgA or IgM isotype. IgA is the major Ig isoform produced at mucosal surfaces and plays a major role in the tissue immune function. ACPA-IgA have been found within inflamed lungs and gastrointestinal tissues of RA patients.²⁷ The greatest differences were observed with the IgM isotype. Given the short half-life of IgM, the small proportion of IgM Anti-CarP seen in PR patients may be interpreted as a sign of discontinuous activation of the B cell immune response to modified proteins.²⁸ ACPA followed a similar isotype pattern in PR when analyzed in a previous study.⁸

The differing AMPA profile in PR patients, with a more restricted pattern, has also been described in

the preclinical phases of RA¹⁰ and in unaffected relatives of RA patients²⁹ and may account for a less pathogenic role of these autoantibodies.³⁰ ACPA and Anti-CarP may be present several years before RA onset,^{10,31} and the specificities and titers of both antibodies seem to increase close to RA onset.^{10,32} Although all ACPA isotypes may be present in the pre-RA stage,³¹ IgG is the predominant isotype and appears earlier than IgM and IgA.³³ It is likely that Anti-CarP isotypes behave similarly in individuals at risk of RA, such as PR patients. Whether this more isotype-restricted AMPA repertoire pattern, with less IgA and IgM isotype use in PR patients, is associated with less propensity to RA progression is unclear. Other factors, such as Fc-glycosylation, have been suggested to play a critical role.²⁸

Our study has the limitations of a small sample size and a selection bias towards treated PR patients with a longstanding disease course, who are probably less prone to evolving to RA, and the results probably cannot be extrapolated to patients with recent onset PR. In addition, the cross-sectional design limited our ability to draw

conclusions on the clinical significance or the predictive value for RA progression of our findings.

Conclusion

In conclusion, as with RF and ACPA, Anti-CarP are found in patients with pure PR. Although it is unclear whether PR is a separate entity or a pre-clinical or abortive form of RA,^{2,3,34} the similar serological profile observed in PR, even without evolution to persistent arthritis fulfilling RA criteria, strongly suggests that PR may form part of the clinical spectrum of RA. A restricted pattern, with a lower proportion and less isotype usage of Anti-CarP in PR than in RA, suggests a distinct B-cell response against post-translational antigens, which may explain the non-evolution to RA in some patients. However, further studies including recent-onset PR patients are needed to validate our findings, as are long-term prospective evaluations of the clinical significance of the restricted AMPA pattern in PR patients.

Acknowledgements

The authors thank Nuria Sapena and Cristina González Delaurens for sera sampling support and assistance.

Author contributions

RC, SR, SC, IH and RS contributed to the conception and study design. MG, CG and IH conceived, designed and performed the ELISA tests. JI, JR, RM, GS and JG collected samples. RC, SC, VR, JG and AC contributed to data collection. RC, SR, RS and JC analyzed and interpreted the data. RC and RS wrote the first version of the manuscript and JR, JG, JC and IH revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the study are available from the corresponding author upon reasonable request.


Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by the Hospital Clinic of Barcelona, Research, Innovation and Education Department (Grant # 37933 to RC) and the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and the European Regional Development Fund (Grant # RTI2018-094120-B-I00 to IH).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

ORCID iDs

Raul Castellanos-Moreira  <https://orcid.org/0000-0002-4104-4101>

Julio Ramirez  <https://orcid.org/0000-0002-7047-8056>

Raimon Sanmarti  <https://orcid.org/0000-0002-8864-3806>

References

- Sanmarti R, Canete JD and Salvador G. Palindromic rheumatism and other relapsing arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 647–661.
- Mankia K and Emery P. Palindromic rheumatism as part of the rheumatoid arthritis continuum. *Nat Rev Rheumatol* 2019; 15: 687–695.
- Salvador G, Gomez A, Vinas O, *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; 42: 972–975.
- Russell AS, Devani A and Maksymowych WP. The role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting progression of palindromic rheumatism to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33: 1240–1242.
- Khabbazi A, Hajjaliloo M, Kolahi S, *et al.* A multicenter study of clinical and laboratory findings of palindromic rheumatism in Iran. *Int J Rheum Dis* 2012; 15: 427–430.
- Mankia K, D'Agostino MA, Wakefield RJ, *et al.* Identification of a distinct imaging phenotype may improve the management of palindromic rheumatism. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 43–50.
- Sanmarti R, Cabrera-Villalba S, Gomez-Puerta JA, *et al.* Palindromic rheumatism with positive anticitrullinated peptide/protein antibodies is not synonymous with rheumatoid arthritis. A longterm followup study. *J Rheumatol* 2012; 39: 1929–1933.
- Cabrera-Villalba S, Gomara MJ, Canete JD, *et al.* Differing specificities and isotypes of anti-citrullinated peptide/protein antibodies in palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 141.

9. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, *et al.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 17372–17377.
10. Brink M, Verheul MK, Ronnelid J, *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; 17: 25.
11. Ten Brinck RM, van Steenberg HW, van Delft MAM, *et al.* The risk of individual autoantibodies, autoantibody combinations and levels for arthritis development in clinically suspect arthralgia. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56: 2145–2153.
12. Castellanos-Moreira R, Rodriguez-Garcia SC, Gomara MJ, *et al.* Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 587–594.
13. Guerne PA and Weisman MH. Palindromic rheumatism: part of or apart from the spectrum of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1992; 93: 451–460.
14. Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Salvador G, *et al.* Is there subclinical synovitis in patients with palindromic rheumatism in the intercritical period? A clinical and ultrasonographic study according to anticitrullinated protein antibody status. *J Rheumatol* 2014; 41: 1650–1655.
15. Perez ML, Gomara MJ, Ercilla G, *et al.* Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2007; 50: 3573–3584.
16. Malakoutikhah M, Gomara MJ, Gomez-Puerta JA, *et al.* The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2011; 54: 7486–7492.
17. Truchetet ME, Dublanc S, Barnetche T, *et al.* Association of the presence of anti-carbamylated protein antibodies in early arthritis with a poorer clinical and radiologic outcome: data from the French ESPOIR cohort. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69: 2292–2302.
18. Sanmarti R, Graell E, Perez ML, *et al.* Diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric fibrin/filaggrin citrullinated synthetic peptides in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R135.
19. Gomara MJ, Rodriguez J, Bleda MJ, *et al.* Comparative study of the diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric citrullinated synthetic peptides and CCP3/CCP3.1 assays. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 285–293.
20. Pecani A, Alessandri C, Spinelli FR, *et al.* Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 276.
21. van Delft MAM, Verheul MK, Burgers LE, *et al.* The isotype and IgG subclass distribution of anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 190.
22. Shi J, Willemze A, Janssen GM, *et al.* Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the ‘AMC-Senshu’ method. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 148–150.
23. Kissel T, Reijm S, Slot LM, *et al.* Antibodies and B cells recognising citrullinated proteins display a broad cross-reactivity towards other post-translational modifications. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 472–480.
24. Sahlstrom P, Hansson M, Steen J, *et al.* Different hierarchies of anti-modified protein autoantibody reactivities in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. Epub ahead of print 5 June 2020. DOI: 10.1002/art.41385.
25. Kampstra ASB, Dekkers JS, Volkov M, *et al.* Different classes of anti-modified protein antibodies are induced on exposure to antigens expressing only one type of modification. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 908–916.
26. Canete JD, Arostegui JI, Queiro R, *et al.* An unexpectedly high frequency of MEFV mutations in patients with anti-citrullinated protein antibody-negative palindromic rheumatism. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2784–2788.
27. Holers VM, Demoruelle MK, Kuhn KA, *et al.* Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. *Nat Rev Rheumatol* 2018; 14: 542–557.
28. Scherer HU, Huizinga TWJ, Kronke G, *et al.* The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2018; 14: 157–169.
29. Koppejan H, Trouw LA, Sokolove J, *et al.* Role of anti-carbamylated protein antibodies compared to anti-citrullinated protein antibodies in indigenous North Americans with rheumatoid arthritis, their first-degree relatives, and healthy controls. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68: 2090–2098.
30. Ioan-Facsinay A, Willemze A, Robinson DB, *et al.* Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein

- antibody in health and disease. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3000–3008.
31. Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, et al. Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R13.
32. Brink M, Hansson M, Mathsson L, et al. Multiplex analyses of antibodies against citrullinated peptides in individuals prior to development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 899–910.
33. Kelmenson LB, Wagner BD, McNair BK, et al. Timing of elevations of autoantibody isotypes prior to diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2020; 72: 251–261.
34. Katz SJ and Russell AS. Palindromic rheumatism: a pre-rheumatoid arthritis state? *J Rheumatol* 2012; 39: 1912–1913.

Visit SAGE journals online
[journals.sagepub.com/
home/tab](https://journals.sagepub.com/home/tab)

 SAGE journals

Resumen del primer trabajo

El RP es una forma intermitente de artritis / periartrosis que puede progresar a poliartritis persistente, principalmente AR, en la mayoría de los casos. Los pacientes con RP pueden tener el perfil característico de autoanticuerpos que se observa en la AR. Los ACPA son un biomarcador para la progresión a AR en pacientes con RP. Estos anticuerpos son el único tipo de AMPA que se ha analizado en RP. Los anti-CarP son un AMPA diferente a los encontrados con frecuencia en los pacientes con AR. Los anti-CarP también se han descrito en poblaciones de riesgo de progresar hacia AR (familiares de primer grado de AR o artralgias inflamatorias) y se han posicionado como un biomarcador de progresión de la AR en estos sujetos.

El objetivo del presente estudio es analizar la prevalencia de dos especificidades de anti-CarP en pacientes con RP y comparar la respuesta de isotipos (IgG, IgA e IgM) de anti-CarP con el de los pacientes con AR.

Se incluyeron 54 pacientes con RP y un grupo control de pacientes con AR pareado por sexo, edad, positividad de ACPA y duración de la enfermedad. Los anti-CarP fueron positivos (CFFHP o FCS) en el 24% y el 64% de los pacientes con RP y AR, respectivamente ($p < 0,005$). Todas las proporciones de isotipos anti-CarP fueron significativamente más bajas en RP que en AR: anti-CarP-IgG (24% vs 51%), anti-CarP-IgA (7% vs 34%) y anti-CarP-IgM (7% vs 36%). Los títulos medios de los isotipos anti-CarP también fueron más bajos en los pacientes con RP.

En cuanto a la distribución de los isotipos, se observaron ciertas diferencias entre el RP y la AR. Entre los pacientes con anti-CarP positivo, la respuesta de IgG anti-CarP fue similar en ambos grupos (100% en RP vs 79% en AR). Sin embargo, la respuesta de isotipos fue significativamente menor en la IgA (31% vs 53%) e IgM (31% vs 56%) en pacientes con RP.

INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en las características clínicas o demográficas según el estado de anti-CarP en pacientes con RP, excepto por una mayor prevalencia de ACPA y títulos medios más altos de ACPA y factor reumatoide en pacientes con anti-CarP positivos.












Conclusión: Los anti-CarP se encuentran en pacientes con RP, aunque con menor frecuencia y con un patrón restringido de isotipos en comparación a la AR establecida. Todo ello sugiere una respuesta distinta de las células B a los antígenos homocitrulinados en el RP.

SEGUNDO TRABAJO

Rheumatoid Arthritis Initiating as Palindromic Rheumatism: A Distinct Clinical Phenotype?

Raul Castellanos-Moreira, Sebastian C. Rodriguez-Garcia, José A. Gómez-Puerta, Virginia Ruiz-Esquide, Oscar Camacho, Julio Ramírez, Andrea Cuervo, Rosa Morlà, Juan D. Cañete, Isabel Haro, and Raimon Sanmartí

Rheumatoid Arthritis Initiating as Palindromic Rheumatism: A Distinct Clinical Phenotype?

Raul Castellanos-Moreira , Sebastian C. Rodriguez-Garcia , José A. Gómez-Puerta , Virginia Ruiz-Esquide , Oscar Camacho , Julio Ramírez , Andrea Cuervo , Rosa Morlà , Juan D. Cañete , Isabel Haro , and Raimon Sanmarti 

ABSTRACT. Objective. To analyze the prevalence of preexisting palindromic rheumatism (PR) in patients with established rheumatoid arthritis (RA) and to evaluate whether these patients have a distinctive clinical and serological phenotype.

Methods. Cross-sectional study in patients with established RA. Preexisting PR was determined using a structured protocol and confirmed by retrospective review of medical records. Demographic, clinical, radiological, immunological, and therapeutic features were compared in patients with and without PR.

Results. Included were 158 patients with established RA (78% female) with a mean disease duration since RA onset of 5.1 ± 2.7 years. Preexisting PR was recorded in 29 patients (18%). The median time from the onset of PR to progression to RA was 1.2 years. No between-group differences in demographic features, current disease activity, radiographic erosive disease, or disability were observed. Patients with PR had a higher prevalence of smoking (72% vs 40%). Positive rheumatoid factor, anticitrullinated peptide antibodies, and anticarbamylated protein antibodies were numerically higher in patients with PR. No differences in treatment were observed except for greater hydroxychloroquine (HCQ) use in patients with PR (38% vs 6%). Palindromic flares persisted in a significant proportion of patients during the RA course, including patients in clinical remission or receiving biological disease-modifying antirheumatic drugs.

Conclusion. Eighteen percent of patients with RA had a history compatible with PR previous to RA onset. No specific clinical or serological phenotype was identified in these patients, although higher HCQ use and smoking prevalence were identified. Palindromic flares may persist during the RA disease course despite treatment. (First Release January 15 2020; J Rheumatol 2020;47:652–7; doi:10.3899/jrheum.190061)

Key Indexing Terms:

PALINDROMIC RHEUMATISM
ANTICITRULLINATED PROTEIN ANTIBODIES
ANTICARBAMYLATED PROTEIN ANTIBODIES

RHEUMATOID ARTHRITIS
HYDROXYCHLOROQUINE
SMOKING

From the Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain.

This study was supported by a grant from the Hospital Clínic of Barcelona, Research, Innovation and Education Department (Raul Castellanos-Moreira, Premi Fi de residència: Emili Letang 37933).

R. Castellanos-Moreira, MD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; S.C. Rodriguez-Garcia, MD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; J.A. Gómez-Puerta, MD, PhD, MPH, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; V. Ruiz-Esquide, MD, PhD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; O. Camacho, MD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; J. Ramírez, MD, PhD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; A. Cuervo, MD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; R. Morlà, MD, PhD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; J.D. Cañete, MD, PhD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona; I. Haro, PhD, Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC; R. Sanmarti, MD, PhD, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona.

Address correspondence to Dr. R. Sanmarti, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona, Spain 08036. E-mail: sanmarti@clinic.cat

Accepted for publication July 8, 2019.

Palindromic rheumatism (PR) is a form of intermittent arthritis that may evolve to chronic rheumatic disease, mainly rheumatoid arthritis (RA)¹. It is unclear whether PR is a separate clinical syndrome, an abortive form of RA, or just a preclinical phase of RA^{2,3}. It is possible that PR forms part of the same spectrum as RA, given the high rate of progression toward RA (in up to 67% of cases in 1 series⁴) and a similar autoantibody profile, including rheumatoid factor (RF) and anticitrullinated peptide antibodies (ACPA)⁵. However, PR is intermittent, periarticular inflammation occurs during flares, and not all patients evolve to RA, suggesting that in some cases PR can be considered a distinct disease entity^{2,6}. Positive autoantibody status is a biomarker

for progression to RA⁷, although a significant proportion of seropositive patients with PR do not develop RA in the long term, with intermittent arthritis persisting⁸.

Studies have analyzed prognostic factors and progression to RA in patients with PR^{7,8,9,10,11}, even though none has reported the prevalence of preexisting PR in patients with established RA or whether these patients have a distinctive clinical and/or serological phenotype. In clinical practice, we have observed various patients with preexisting PR who presented typical palindromic flares after RA was diagnosed, including patients in clinical remission.

The aims of our study were to analyze the prevalence of intermittent arthritis compatible with PR before RA onset, differences in the clinical phenotype and immunological and therapeutic features among established RA patients with and without preexisting PR and whether typical intermittent arthritis flares continued after RA onset.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a cross-sectional study in consecutive patients attending the Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Catalonia, Spain, between July 2017 and July 2018. Inclusion criteria were RA according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria, with a disease duration < 10 years since RA onset. Exclusion criteria were other inflammatory arthritis or connective tissue diseases diagnosed before the inclusion visit according to standard criteria. Medical records were reviewed retrospectively in all patients.

The following variables were collected: demographic characteristics, smoking status (current or previous smoking and cumulative exposure), RA duration, extraarticular manifestations (EAMS) according to predefined criteria¹², current disease activity measured by the 28-joint count Disease Activity Score (DAS28), the Simplified Disease Activity Index, and the Clinical Disease Activity Index. Data collected were patient-reported outcomes such as the Routine Assessment of Patient Index Data 3, and disability as measured by the Health Assessment Questionnaire–Disability Index. A pain visual analog scale was administered. The number and distribution of joints involved at RA onset were collected retrospectively; hand and foot radiographs were obtained at study entry and radiographic erosions were evaluated. Previous and current conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARD), biological DMARD (bDMARD), and glucocorticoid use were evaluated.

Current autoantibody status was measured: RF by nephelometry, ACPA by anticyclic citrullinated peptide antibodies (QUANTA Flash CCP3, chemiluminescent immunoassay), and anticarbamylated protein antibodies (anti-CarP) by a homemade ELISA test using fetal calf serum, as previously described by Montes, *et al*¹³. Autoantibody status for RF and ACPA was also evaluated during the PR phase in patients with available data. Anti-CarP data were not available during this period, because they are not routinely tested in clinical practice.

One objective of our study was to identify patients with a history compatible with PR before RA diagnosis. A specific questionnaire (Supplementary Data 1, available with the online version of this article) was administered at study entry, asking patients for the presence of acute intermittent joint attacks of short duration (< 1 week) compatible with PR, defined as pain with or without swelling or erythema. PR flares/symptoms associated with articular or periarticular inflammatory signs (swelling and/or erythema) that were directly observed by the treating physician and documented in the medical record were also assessed. In patients with a history compatible with previous PR not explained by other causes, we determined whether these typical acute flares persisted after RA diagnosis until

study entry, especially regarding the number and characteristics of flares in the 12 months before study inclusion. Medical records were completely reviewed to corroborate symptoms compatible with PR before RA onset and whether the flares were observed by the treating physician. Owing to the retrospective design of the study, no specific classification criteria for PR were used. Only patients with both an inclusion visit protocol and medical records compatible with PR were categorized as PR, unless symptoms could not explain by other causes. PR disease duration was defined as date from PR onset to RA onset. RA disease duration was calculated from RA disease onset to the inclusion visit.

Our study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Clinic of Barcelona Clinical Research Ethics Committee (ethics approval number 2017/0679). Signed informed consent was obtained from all patients before study enrollment.

Statistical analysis. We compared the study variables in RA patients with and without preexisting PR. Proportions were calculated using the chi-square test or Fisher's exact test when expected counts were ≤ 5 . Continuous variables were analyzed using the parametric Student *t* test or the nonparametric Mann-Whitney *U* test when there was a non-normal distribution. A cumulative probability plot was constructed to assess the time from PR onset to RA onset. Continuous data are presented as means and SD or median and interquartile range, according to the distribution and categorical variables as absolute frequencies and percentages. The level of statistical significance was established as ≤ 0.05 . The analysis was made using IBM SPSS for Windows version 23.0.

RESULTS

Prevalence of PR before RA onset. A total of 158 patients (78% female) were included, with a mean age of 58.8 ± 13.1 years and a disease duration since RA onset of 5.1 ± 2.7 years. Twenty-nine patients (18%) presented a history compatible with PR before RA onset, with joint flares, typically monoarticular, mostly lasting < 72 h, which could not be explained by other diseases, such as crystal arthritis. Eighteen patients who reported PR symptoms in the questionnaire were finally classified as having inflammatory arthralgia ($n = 13$) or polymyalgia-like syndrome ($n = 5$) because of more persistent symptoms (> 1 week) and clinical characteristics after review of medical records. These patients were included and analyzed in the non-PR group.

The mean age at PR diagnosis was 47.9 ± 14.2 years. The median time between PR onset and RA onset was 1.2 years (percentile 25–p75: 0.5–3.9; Figure 1). Before RA onset, patients with PR were treated with on-demand nonsteroidal antiinflammatory drugs (76%) and glucocorticoids (21%), and 7 patients (24%) received a csDMARD, in most cases hydroxychloroquine (HCQ; 17%).

Clinical, therapeutic, and immunologic features in patients with and without PR. No significant differences were observed in demographic features, disease duration, current disease activity, remission rates, disability indices, and the frequency of erosive disease between patients with and without preexisting PR (Table 1). A significantly higher prevalence of ever smokers (current or previous) was observed in patients with preexisting PR (72% vs 40%), although no significant difference was observed in current smoking (24% vs 16%) or cumulative smoking exposure (24.1 ± 11.8 pack-yrs vs 23.5 ± 14.0 pack-yrs). At RA onset,

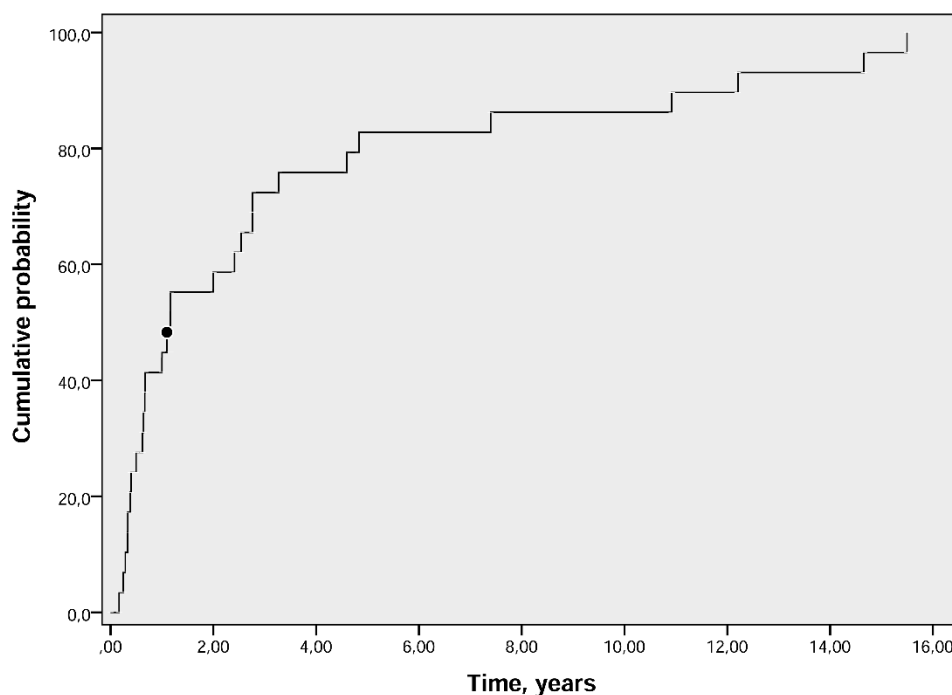


Figure 1. Cumulative probability plot of time (years) from PR diagnosis to RA onset. The median time between PR onset and RA onset was 1.2 (black dot) years (p25-p75: 0.5–3.9). PR: palindromic rheumatism; RA: rheumatoid arthritis.

patients with preexisting PR had a lower mean number of joints involved (4.8 ± 3.1 vs 6.2 ± 2.8), and a slightly higher prevalence of large joint involvement (45% vs 38%), although the differences were not significant. Thirty-six patients presented EAMS, including interstitial lung disease (7% vs 12%), sicca syndrome (21% vs 15%), rheumatoid nodules (14% vs 9%), episcleritis (0% vs 1%), and serositis (0% vs 1%), with no significant differences between patients with or without previous PR.

At study inclusion, autoantibody-positive status was higher in patients with preexisting PR, including RF (72% vs 59%), ACPA (79% vs 66%) and anti-CarP (52% vs 45%) although the differences were not statistically significant. No significant differences in serum titers were found. Only 1 patient with preexisting PR was seronegative for all 3 autoantibodies (Figure 2).

Autoantibody status for RF and ACPA was available in 23 and 21 patients, respectively, during the palindromic phase, before RA onset. RF and ACPA were positive in 11 (48%) and 13 (62%) of these patients, respectively. At study inclusion, positive seroconversion of RF and ACPA was documented in 6 (26%) and 3 (14%) patients, respectively. No patient switched to a negative status.

No differences were observed in current or previous antirheumatic therapy during the RA disease course, except for greater use of HCQ in patients with preexisting PR (38% vs 6%). Current prescription of glucocorticoids and DMARD

is shown in Table 1 and detailed current biologic treatment is described in Supplementary Table 1 (available with the online version of this article).

PR flares after RA diagnosis. At least 1 intermittent flare compatible with PR was recorded in 25 (87%) of the 29 patients with preexisting PR after the diagnosis of RA. Fourteen patients (48%) reported PR flares in the 12 months before the inclusion visit: during this period the median number of flares reported was 6 (range: 1–15). Intermittent flares were reported in this 12-month period in patients in DAS28 clinical remission ($n = 7$) and in those receiving bDMARD ($n = 5$) at the inclusion visit. In 10 of these 14 patients, direct observation of a palindromic flare associated with articular or periarticular inflammatory signs was documented by the treating physician. During these flares observed by the physician, patients were in remission (30%), low disease activity (40%), or moderate/high disease activity (30%) according to DAS28. No differences in drug treatment, including HCQ (40% vs 36%), were found between patients who did or did not report PR flares in the last 12 months.

DISCUSSION

Our results show that 18% of patients with established RA reported intermittent symptoms compatible with PR before RA onset. No differences were observed between RA patients with or without preexisting PR in disease activity status,

Table 1. Demographic, clinical, and therapeutic features of rheumatoid arthritis patients with and without palindromic rheumatism (PR) before disease onset.

Variables	PR at Initiation, n = 29	No PR at Initiation, n = 129	p
Female	21 (72.4%)	102 (79.1%)	NS
Age at RA onset, yrs, mean (± SD)	51.2 (15.1)	54.3 (12.8)	NS
RA disease duration, yrs, mean (± SD)	4.2 (2.5)	5.3 (2.7)	NS
Extraarticular manifestation	6 (20.7%)	30 (23.3%)	NS
Smoking, past or current	21 (72.4%)	51 (39.5%)	< 0.005
RA family history	6 (20.7%)	16 (12.4%)	NS
Large joint involved at onset (%)	13 (44.8%)	48 (37.5%)	NS
Joint number involved at RA onset, mean (± SD)	4.8 (3.1)	6.2 (2.8)	NS
Hand joint involvement at RA onset (%)	28 (96.6%)	108 (85.0%)	NS
RF-positive (%)	21 (72.4%)	76 (58.9%)	NS
RF titer, IU, mean (± SD)	152 (199.7)	228.3 (246.8)	NS
ACPA-positive	23 (79.3%)	85 (65.9%)	NS
ACPA titer, IU, mean (± SD)	798.4 (1001.5)	1225.1 (1068.5)	NS
Anti-CarP-positive (%)	15 (51.7%)	58 (45.0%)	NS
Anti-CarP titer, IU, mean (± SD)	1089 (843.9)	924.7 (801.2)	NS
DAS28 mean (± SD)	2.8 (1.1)	2.9 (1.2)	NS
DAS28 remission rate	44.8%	47.3%	NS
DAS28-CRP mean (± SD)	2.7 (1.0)	2.5 (1.2)	NS
DAS28-CRP remission rate	51.7%	66.7%	NS
CDAI mean (± SD)	7.7 (7.1)	8.2 (7.5)	NS
CDAI remission rate	34.5%	21.7%	NS
SDAI mean (± SD)	8.5 (7.4)	9.0 (7.90)	NS
SDAI remission rate	31.0%	23.3%	NS
RAPID-3 mean (± SD)	7.4 (6.6)	7.9 (6.5)	NS
RAPID-3 remission rate	37.9%	31.7%	NS
HAQ-DI mean (± SD)	0.40 (0.45)	0.36 (0.47)	NS
Pain analog scale, mm, mean (± SD)	25.6 (28.4)	31.4 (90.0)	NS
Erosive disease	16 (55.2%)	67 (52.9%)	NS
Current drug therapy			
Glucocorticoid	18 (62.1%)	75 (58.6%)	NS
csDMARD	26 (89.7%)	108 (83.7%)	NS
MTX	20 (69%)	84 (65.1%)	NS
HCQ	11 (37.9%)	8 (6.2%)	< 0.005
bDMARD	8 (27.6%)	32 (24.8%)	NS
Anti-TNF	6 (20.7%)	18 (14.0%)	NS
Non-anti-TNF	2 (6.9%)	14 (10.9%)	NS

NS: not significant; RA: rheumatoid arthritis; RF: rheumatoid factor; ACPA: anticitrullinated peptide antibodies; anti-CarP: anticarbamylated protein antibodies; DAS28: 28-joint count Disease Activity Score; CRP: C-reactive protein; SDAI: Simplified Disease Activity Index; CDAI: Clinical Disease Activity Index; RAPID-3: Routine Assessment of Patient Index Data 3; HAQ: Health Assessment Questionnaire-Disability Index; csDMARD: conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; MTX: methotrexate; HCQ: hydroxychloroquine; bDMARD: biological DMARD; TNF: tumor necrosis factor.

disability, or erosive disease. PR symptoms persisted in a significant proportion of patients during the RA course.

There are few data on the exact prevalence of PR before RA onset. Our results were very similar to those observed in a multicenter Catalan study that found a prevalence of 15.8%¹⁴. In the Canadian CATCH early RA cohort study, the reported prevalence was 40%, although the definition of intermittent arthritis possibly reflecting PR was only analyzed using a self-reported questionnaire¹⁵. The latency period of 1.2 years between the onset of PR and the onset of RA confirms that most patients, and especially those with auto-antibodies, develop RA in the first years of PR symptoms⁴.

Whether PR represents a specific clinical phenotype of RA is unclear. We found no significant differences in disease activity, remission rates, disability, and erosive disease

between patients with and without PR. However, we found a higher proportion of smokers in patients with preexisting PR, although no differences in current smoking or the cumulative exposure were found. The prevalence of current smokers (24%) was similar to that seen in patients with PR in the only 2 studies that address this issue, which was 21–32%^{6,16} and similar to the 25% found in the Spanish RA population in the COMORA study¹⁷ and the 30% in our early RA cohort¹⁸. We have no satisfactory explanation for this finding and cannot say whether it may reflect the high proportion of seropositive disease observed in these patients, because a clear trend to RF and ACPA positivity was found in ever smokers. Smoking has been associated with seropositive RA and named as a risk factor for RA in patients with arthralgia and ACPA positivity^{19,20}. It may be hypothesized that patients with PR,

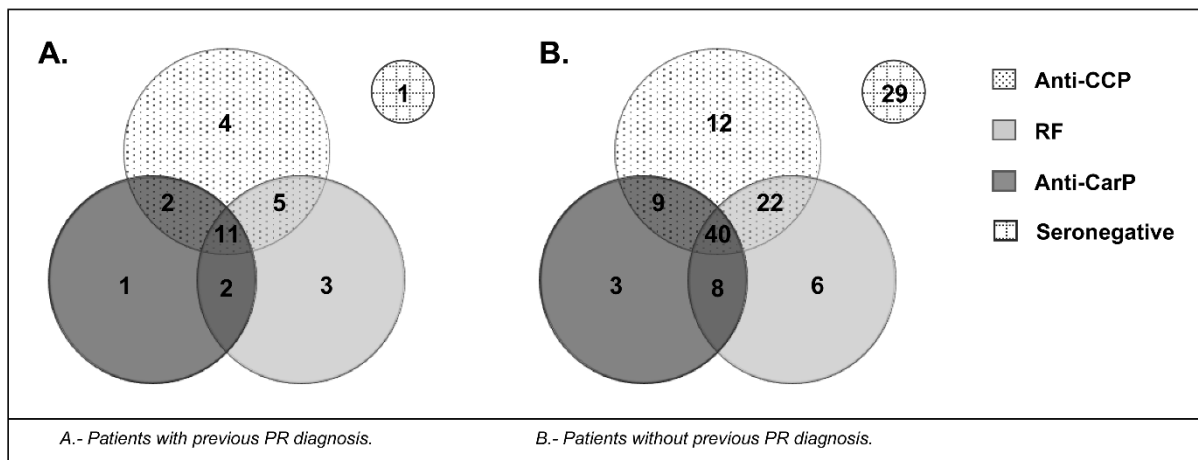


Figure 2. Serum autoantibodies in RA according to the presence of PR at initiation. RA: rheumatoid arthritis; PR: palindromic rheumatism; anti-CCP: anticyclic citrullinated peptide antibodies; RF: rheumatoid factor; anti-CarP: anticarbamylated protein antibodies.

where ACPA positivity is frequent, with a history of smoking during the PR phase and a high cumulative smoking exposure might be more prone to evolve toward RA. A high prevalence of smoking was identified in RA patients with previous intermittent symptoms in the CATCH study¹⁵.

Autoantibody status was similar in both groups, but there was a trend to greater autoantibody seropositivity in patients with PR, in line with the high prevalence of RF and ACPA in patients with PR without RA⁵⁻¹¹. A lower rate of ACPA fine specificities and isotypes has been reported in PR when compared to RA²¹, although we did not evaluate these ACPA features. However, similar ACPA characteristics were expected in this cohort, because all patients included had established RA (mean duration 5.1 yrs) when autoantibodies were analyzed. Information on anti-CarP antibodies in PR is scarce; our group recently found that the prevalence of anti-CarP antibodies in patients with PR was 16.7%²².

A significant proportion of patients with preexisting PR had flares typical of PR after RA onset, to our knowledge a previously unreported finding. This suggests that these patients retain this phenotype after RA onset and may be refractory to DMARD that might achieve satisfactory control of persistent arthritis but not of palindromic flares. Typical PR flares persist after RA onset in some patients, even though RA itself remained in remission/low disease activity or under biologic therapy. We have no satisfactory explanation for this finding. Palindromic flares, with the abrupt onset and rapid resolution of the crisis, the intermittent character, and the involvement of periarticular tissues may resemble an auto-inflammatory disorder; therefore, the pathogenesis of this clinical phenotype, with a more relevant role for the innate immunity than in persistent chronic synovitis, cannot be excluded³. We have previously reported an unexpectedly high frequency of *MEFV* mutations in patients diagnosed as PR,

although almost all had seronegative disease (RF or ACPA)²³. However, more recently, Savic, *et al*²⁴ reported a series of patients with seropositive RA with sudden onset of severe self-limiting flares, in whom mutations or single-nucleotide polymorphisms of autoinflammatory genes were confirmed, suggesting that, in rare cases, RA and an autoinflammatory disorder may coexist. We did not analyze autoinflammatory genes, although no other features were recorded, such as fever, cutaneous involvement, or serositis.

No differences in csDMARD, bDMARD, or glucocorticoid use were observed between the 2 groups, although we observed a significantly greater use of HCQ in combination with other DMARD in patients with RA and PR. This is not unexpected considering that this drug is commonly used in PR with good results²⁵. It is difficult to establish whether HCQ use may prevent palindromic flares in the RA phase. We found a similar prevalence of persistence of palindromic flares in patients with or without HCQ use, but this may be due to confounding by indication. The study design does not permit definitive conclusions on the effectiveness of HCQ.

The study had some limitations. First, the diagnostic criteria of PR were not applied because of the retrospective design of the study: the definition of palindromic flares was noted in the medical record but focused on the typical symptoms of PR, in which our group have extensive experience^{1,5,8,16,21-23}. Second, the data on RA features at disease onset were recorded retrospectively and we did not determine whether, in this early phase, the clinical or serological phenotype may differ between patients with or without PR, although we found a lower number of affected joints at RA onset. Third, the small sample size is one reason why the conclusions should be considered with caution.

Almost 1 in 5 patients with RA in our cohort had a history compatible with PR previous to RA onset. No differences in

disease severity and no distinctive clinical or serological phenotypes were found in these patients in the RA phase, although palindromic flares may persist in a significant proportion of patients even after the use of DMARD. The role of smoking in PR and the possible effects of HCQ in these patients in aborting palindromic flares merit further investigation.

ONLINE SUPPLEMENT

Supplementary material accompanies the online version of this article.

REFERENCE

1. Sanmarti R, Cañete JD, Salvador G. Palindromic rheumatism and other relapsing arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18:647-61.
2. Katz SJ, Russell AS. Palindromic rheumatism: a pre-rheumatoid arthritis state? *J Rheumatol* 2012;39:1912-3.
3. Mankia K, Emery P. What can palindromic rheumatism tell us? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017;31:90-8.
4. Koskinen E, Hannonen P, Sokka T. Palindromic rheumatism: long-term outcomes of 60 patients diagnosed in 1967-84. *J Rheumatol* 2009;36:1873-5.
5. Salvador G, Gomez A, Vinas O, Ercilla G, Cañete 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* 2003;42:972-5.
6. Mankia K, D'Agostino M, Wakefield R, Nam J, Mahmood W, Grainger A. Identification of a distinct imaging phenotype may improve the management of palindromic rheumatism. *Ann Rheum Dis* 2018;78:43-50.
7. Russell AS, Devani A, Maksymowych WP. The role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting progression of palindromic rheumatism to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:1240-2.
8. Sanmarti R, Cabrera-Villalba S, Gomez-Puerta JA, Ruiz-Esquide V, Hernandez MV, Salvador G, et al. Palindromic rheumatism with positive anticitrullinated peptide/protein antibodies is not synonymous with rheumatoid arthritis. A longterm followup study. *J Rheumatol* 2012;39:1929-33.
9. Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Jhangri GS, Ramos-Remus C, Russell AS, Suarez-Almazor ME. Prognostic factors for the development of rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases in patients with palindromic rheumatism. *J Rheumatol* 1999;26:540-5.
10. Tamai M, Kawakami A, Iwamoto N, Arima K, Aoyagi K, Eguchi K. Contribution of anti-CCP antibodies, proximal interphalangeal joint involvement, HLA-DRB1 shared epitope, and PADI4 as risk factors for the development of rheumatoid arthritis in palindromic rheumatism. *Scand J Rheumatol* 2010;39:287-91.
11. Emad Y, Anbar A, Abo-Elyoun I, El-Shaarawy N, Al-Hanafi H, Darwish H, et al. In palindromic rheumatism, hand joint involvement and positive anti-CCP antibodies predict RA development after 1 year of follow-up. *Clin Rheumatol* 2014;33:791-7.
12. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:62-7.
13. Montes A, Regueiro C, Perez-Pampin E, Boveda MD, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Anti-carbamylated protein antibodies as a reproducible independent type of rheumatoid arthritis autoantibodies. *PLoS One* 2016;11:e0161141.
14. Corominas H, Narváez J, Díaz-Torné C, Salvador G, Gomez-Caballero M, de la Fuente D, et al. Diagnostic and therapeutic delay of rheumatoid arthritis and its relationship with health care devices in Catalonia. The AUDIT study. *Reumatol Clin* 2016;12:146-50.
15. Ellingwood L, Schieir O, Bartlett SJ, Bessette L, Hitchon CA, Boire G, et al. Characterizing palindromic symptoms in early rheumatoid arthritis: results from the Canadian Early Arthritis Cohort Study [abstract]. *Arthritis Rheumatol* 2018;70 Suppl 10:2465.
16. Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Salvador G, Ruiz-Esquide V, Hernández M, Inciarte-Mundo J, et al. Is there subclinical synovitis in patients with palindromic rheumatism in the intercritical period? A clinical and ultrasonographic study according to anticitrullinated protein antibody status. *J Rheumatol* 2014;41:1650-5.
17. Dougados M, Soubrier M, Antunez A, Balint P, Balsa A, Buch M, et al. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Ann Rheum Dis* 2013;73:62-8.
18. Ruiz-Esquide V, Gómez-Puerta J, Cañete J, Graell E, Vazquez I, Ercilla MG, et al. Effects of smoking on disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:2536-9.
19. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R61.
20. de Hair M, Landewé R, van de Sande M, van Schaardenburg D, van Baarsen L, Gerlag D, et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;72:1654-8.
21. Cabrera-Villalba S, Gomara MJ, Cañete JD, Ramirez J, Salvador G, Ruiz-Esquide V, et al. Differing specificities and isotypes of anti-citrullinated peptide/protein antibodies in palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:141.
22. Castellanos-Moreira R, Ruiz-Esquide V, Gomara MJ, Cabrera-Villalba S, Rodriguez-Garcia SC, Salvador G, et al. ANTI-carbamylated protein antibodies (CARP) in palindromic rheumatism: prevalence and clinical significance [abstract]. *Arthritis Rheumatol* 2017;69 Suppl 10:480.
23. Cañete J, Arostegui J, Queiró R, Gratacós J, Hernández M, Larrosa M. An unexpectedly high frequency of MEFV mutations in patients with anti-citrullinated protein antibody-negative palindromic rheumatism. *Arthritis Rheumatol* 2007;56:2784-8.
24. Savic S, Mistry A, Wilson A, Barcenas-Morales G, Dollinger R, Emery P. Autoimmune-autoinflammatory rheumatoid arthritis overlaps: a rare but potentially important subgroup of diseases. *RMD Open* 2017;3:e000550.
25. Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Jhangri G, Russell AS, Suarez-Almazor ME. Decreased progression to rheumatoid arthritis or other connective tissue diseases in patients with palindromic rheumatism treated with antimalarials. *J Rheumatol* 2000;27:41-6.

Online supplement to Rheumatoid Arthritis Initiating as Palindromic Rheumatism: A Distinct Clinical Phenotype? *The Journal of Rheumatology*, doi:10.3899/jrheum.190061

Supplementary Data 1. Specific questionnaire administered at study entry to determine if intermittent symptoms compatible with palindromic rheumatism flares were present before RA onset and if these flares persisted after RA diagnosis with especial interest in the last 12 months.

- At your disease onset, did you present intermittent flares/attacks of pain, with or without swelling and/or redness of a joint that last less than a week?
 - Yes
 - No

If the answer is yes, continue to the next question.

If the answer is no you have finished the questionnaire, please give back this form to the interviewer.

- After RA diagnosis, have you presented these intermittent flares/attacks that last less than a week?
 - Yes
 - No

If the answer is yes, continue to the next question

If the answer is no you have finished the questionnaire, please give back this form to the interviewer.

- Do you recall any of these flares in the last 12 months?
 - Yes
 - No

If the answer is yes, continue to the next question

If the answer is no you have finished the questionnaire, please give back this form to the interviewer.

- On average, how many flares or attacks (less than a week of duration) have occurred in the last year?
 - Number of flares/attacks:

you have finished the questionnaire, please give back this form to the interviewer.

Online supplement to Rheumatoid Arthritis Initiating as Palindromic Rheumatism: A Distinct Clinical Phenotype? *The Journal of Rheumatology*, doi:10.3899/jrheum.190061

Supplementary Table 1. Current biologic treatment in rheumatoid arthritis patients according to the presence of palindromic rheumatism (PR) at disease initiation.

	PR at initiation n: 29	No PR at initiation n: 129	p value
Infliximab	0 (0%)	1 (0.8%)	NS
Etanercept	5 (17.2%)	9 (7.0%)	NS
Adalimumab	1 (3.4%)	1 (0.8%)	NS
Certolizumab	0 (0%)	6 (4.7%)	NS
Golimumab	0 (0%)	1 (0.8%)	NS
Abatacept	0 (0%)	4 (3.1%)	NS
Rituximab	1 (3.4%)	5 (3.9%)	NS
Tocilizumab	1 (3.4%)	5 (3.9%)	NS

Resumen del segundo trabajo

Hoy en día, sabemos que un subgrupo de pacientes con AR debuta de su enfermedad en forma de RP. Los estudios realizados hasta la actualidad se han centrado en analizar los factores pronósticos y de progresión a AR en la población con RP. Aunque la alta tasa de progresión es una circunstancia bien conocida, no hay estudios que hayan cuantificado claramente la prevalencia de RP preexistente en pacientes con AR establecida o si estos pacientes tienen un fenotipo serológico o clínico distintivo.

Los objetivos de este estudio fueron analizar la prevalencia de artritis intermitente compatible con RP previo al inicio de la AR, las diferencias en el fenotipo clínico y perfil de anticuerpos (incluidos los anti-CarP) entre pacientes con AR establecidos con y sin RP preexistente.

Se incluyeron 158 pacientes con AR establecida (78% mujeres) con una duración media de la enfermedad desde el inicio de la AR de $5,1 \pm 2,7$ años. La RP preexistente se registró en 29 pacientes (18%). La mediana del tiempo desde el inicio de RP hasta la progresión a AR fue de 1,2 años. No se observaron diferencias entre los grupos en las características demográficas, la actividad actual de la enfermedad, enfermedad erosiva radiográfica o discapacidad. No se observaron diferencias en el tratamiento, excepto por un mayor uso de hidroxicloroquina en pacientes con RP (38% vs 6%). La tasa tabaquismo fue mayor en el grupo de pacientes con RP, tanto como antecedente previo (72% vs 42%), como al momento de inclusión en el estudio (24% vs 16%) o al comparar dosis acumulada de tabaquismo.

Al analizar el perfil serológico, la positividad de anticuerpos fue numéricamente más alta para los pacientes con RP preexistente, tanto en los anti-CarP (52% vs 45%), ACPA (79% vs 66%) y FR (72% vs 59%) aunque las diferencias no fueron

estadísticamente significativas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los títulos séricos.

Los brotes palindrómicos típicos persistieron en una proporción significativa (87%) de pacientes durante el curso de la AR, incluso en aquellos en remisión clínica o que recibieron FAMEs biológicos.

En conclusión, el 18% de los pacientes de nuestra cohorte de AR, presentan antecedentes compatibles con RP antes del inicio de la AR. No se identificó un perfil serológico específico en estos pacientes. No encontramos diferencias en el fenotipo clínico, salvo un mayor uso de hidroxicloroquina, mayor prevalencia de tabaquismo y persistencia de crisis palindrómicas en un subgrupo importante de pacientes tras el diagnóstico AR, a pesar del tratamiento.



TERCER TRABAJO

Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease

Raul Castellanos-Moreira, Sebastian Cruz Rodríguez-García, María Jose Gomara, Virginia Ruiz-Esquide, Andrea Cuervo, Ivette Casafont-Solé, Julio Ramírez, Susana Holgado, Jose A Gómez-Puerta, Juan D Cañete, Isabel Haro, Raimon Sanmarti

CLINICAL SCIENCE

Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease

Raul Castellanos-Moreira ¹, Sebastian Cruz Rodríguez-García ¹, Maria Jose Gomara,² Virginia Ruiz-Esqueda,¹ Andrea Cuervo,¹ Ivette Casafont-Solé,³ Julio Ramírez,¹ Susana Holgado,³ Jose A Gómez-Puerta,¹ Juan D Cañete,¹ Isabel Haro,² Raimon Sanmarti¹

Handling editor Josef S Smolen

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216709>).

¹Rheumatology Department, Arthritis Unit, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain
²Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, CSIC-IQAC, Barcelona, Spain
³Rheumatology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Correspondence to

Dr Raimon Sanmarti, Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona 08036, Spain; sanmarti@clinic.cat

RC-M and SCR-G contributed equally.

Received 25 November 2019
Revised 29 January 2020
Accepted 17 February 2020
Published Online First 10 March 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, et al. *Ann Rheum Dis* 2020;**79**:587–594.

ABSTRACT

Objective To analyse the association between anti-carbamylated protein antibodies (Anti-CarP) and interstitial lung disease (ILD) in rheumatoid arthritis (RA) patients.

Methods Cross-sectional study including RA patients fulfilling the 2010 ACR/EULAR criteria. The main population comprised two groups: (1) RA patients diagnosed with RA-ILD (RA-ILD group); (2) RA patients without ILD (non-ILD RA group). Non-ILD RA patients in whom ILD was suspected underwent a diagnostic work-up and, if ILD was diagnosed, were switched to the RA-ILD group. ILD was diagnosed by high-resolution computed tomography and confirmed by a multidisciplinary committee. An independent replication sample was also obtained. Three Anti-CarP IgG autoantibodies against fetal calf serum (Anti-FCS), fibrinogen (Anti-Fib) and chimeric fibrine/filagrine homocitrullinated peptide (Anti-CFFHP) and one Anti-CarP IgA against FCS (Anti-FCS-IgA) were determined by home-made ELISA. Associations between Anti-CarP and ILD were analysed using multivariable logistic regression adjusted by smoking, sex, age, RA disease duration, rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies.

Results We enrolled 179 patients: 37 (21%) were finally diagnosed with RA-ILD. Anti-CarP specificities were more frequent in RA-ILD patients (Anti-FCS 70% vs 43%; Anti-Fib 73% vs 51%; Anti-CFFHP 38% vs 19%; Anti-CarP-IgA 51% vs 20%, $p < 0.05$ for all comparisons). Serum titers of Anti-CarP were significantly higher in RA-ILD patients. Anti-CarP specificities showed a robust effect towards increasing the odds of ILD in the multivariate analysis (Anti-FCS (OR: 3.42; 95% CI: 1.13 to 10.40), Anti-Fib (OR: 2.85; 95% CI: 0.83 to 9.70), Anti-CFFHP (OR: 3.11; 95% CI: 1.06 to 9.14) and Anti-FCS-IgA (OR: 4.30; 95% CI: 1.41 to 13.04)). Similar findings were observed in the replication sample.

Conclusions Anti-CarP were strongly associated with ILD. The role of homocitrullination in RA-ILD merits further investigation.

INTRODUCTION

Interstitial lung disease (ILD) is a severe extra-articular manifestation of rheumatoid arthritis (RA), that affects 4%–50% of RA patients depending on the screening method and the population

Key messages

What is already known about this subject?

- Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD) entails a high mortality. Therefore, an early detection is crucial in establishing an individualised treatment strategy.
- Anti-carbamylated protein antibodies (Anti-CarP) are associated with poor disease outcomes in RA patients and have been detected in various chronic lung diseases regardless of the RA history.

What does this study add?

- For the first time an association between RA-ILD and Anti-CarP has been found, which was independent of smoking, sex, age, RA disease duration, anticitrullinated protein antibody and rheumatoid factor.

How might this impact on clinical practice or future developments?

- These findings suggest a possible link between homocitrullination and the development of ILD in RA patients exists.

examined.¹ RA-associated ILD (RA-ILD) entails a shortened survival with a mortality rate up to 10 times higher than those without ILD,² prompting a great effort to achieve an earlier diagnosis.

Various risk factors have been identified, including smoking, male sex, higher disease activity, longer disease duration, older age, positive rheumatoid factor (RF) and anticitrullinated protein antibodies (ACPAs).^{1,3} In recent years, several biomarkers have been proposed for RA-ILD screening,^{4,5} although there is no universally accepted screening test.

Anti-carbamylated protein antibodies (Anti-CarP) recognise homocitrullinated peptides, which are generated by a post-translational modification (PTM) of lysine residues.⁶ First described in 2011, Anti-CarP have been associated with poor disease outcomes in RA patients, including higher disease activity and radiographic progression.^{7–9} A recent study found higher mortality in Anti-CarP positive RA patients, which was particularly attributed to

Rheumatoid arthritis

respiratory diseases.¹⁰ Interestingly, Anti-CarP have been found in patients with various non-ILD chronic lung diseases irrespective of smoking or RA history.^{11 12}

The objective of this study was to analyse the association between Anti-CarP and ILD in a population of RA patients.

METHODS

Study design

We performed a cross-sectional study including RA patients diagnosed according to the 2010 ACR/EULAR criteria assessed in a rheumatology department outpatient clinic of a tertiary university hospital. Individuals fulfilling other inflammatory arthritis or connective tissue disease diagnostic criteria were excluded.

Study population

The main population comprised two groups; (1) patients diagnosed with RA-ILD before study inclusion (RA-ILD group); (2) consecutive patients with RA with no diagnosis of ILD, assessed by a single rheumatologist (RC-M) between July 2017 and July 2018 (non-ILD RA group).

All non-ILD RA patients in whom ILD was suspected, underwent an appropriate work-up (see RA-ILD diagnosis section). Subjects resulting in a new diagnosis were switched to the RA-ILD group. Criteria for suspicion were based on the presence of RA-ILD risk factors or persistent symptoms such as dyspnoea or cough. An independent replication sample with similar characteristics was obtained from another hospital.

RA-ILD diagnosis

RA-ILD was diagnosed using high-resolution computed tomography and classified according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society 2013 multidisciplinary classification criteria of idiopathic interstitial pneumonias.¹³ Diagnoses were confirmed by a multidisciplinary committee including pneumologists, radiologists, pathologists, clinical immunologists, internists and rheumatologists.

Demographic, clinical, therapeutic and serological data

In the main population, the variables analysed included demographics (age, sex and ethnicity), disease duration at study inclusion, smoking status and smoking cumulative dose (number of packs per day × number of years of smoking). Disease activity and disability were assessed using the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) and the Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ-DI), respectively. Current conventional synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARDs and bDMARDs, respectively) and glucocorticoid use were evaluated. Hand and foot X-rays were obtained at study entry for analysis of radiological damage.

Antibodies measurement

Autoantibody status was measured in sera collected at study enrolment. Three carbamylated antigens, namely fetal calf serum (FCS), fibrinogen (Fib) and chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide (CFFHP) were obtained. CFFHP and its non-homocitrullinated version were synthesised by solid-phase peptide synthesis following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl/t-butyl strategy with subsequent cyclisation in solution by forming a disulfide bridge.^{14 15} Four Anti-CarP autoantibodies were determined by home-made ELISA tests with either carbamylated proteins or CFFHP as antigens, respectively; three IgG specificities namely Anti-FCS, Anti-Fib and Anti-CFFHP and one IgA specificity against carbamylated FCS (Anti-FCS-IgA). Receiver

operating characteristic (ROC) curve analysis and regression analysis were conducted using the GraphPad Prism5 programme and the cut-off values were determined with a specificity of 95% compared with a healthy population of blood donors (n=179). A series of successive dilutions of a pool of sera from four positive patients was used as a reference standard in all plates and to convert optical density (OD) values to arbitrary units (AU).

A positive cut-off value was defined as ≥ 173.5 AU/mL, ≥ 166.9 AU/mL, ≥ 146.5 AU/mL and ≥ 257.0 AU/mL for Anti-FCS, Anti-Fib, Anti-CFFHP and Anti-FCS-IgA, respectively. A test was only considered positive and specific for homocitrulline when the AU/mL values were higher than the respective cut-off and the OD value difference between carbamylated (homocitrullinated) and native (non-homocitrullinated) antigens was at least 0.1 in agreement with the methodology previously reported.¹⁶ Further details on the ELISA techniques are provided in the online supplementary text.

RF was measured by nephelometry and ACPA was assessed by anti-CCP3 chemiluminescent immunoassay (QUANTA Flash CCP3, Inova Diagnostics). The cut-offs for positive values were 25 international units (IU) and 20 chemiluminescence units (CU), respectively.

Statistical analysis

Between-group differences were analysed using descriptive statistics as appropriate. Proportions were compared using the χ^2 or Fisher's exact test. Continuous variables were analysed using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test and presented as means with SD (\pm) or medians with IQR.

The association between Anti-CarP and ILD was evaluated using logistic regression including a set of variables known to be related to the development of ILD such as smoking, sex, age, RA disease duration, ACPA and RF and others taken from the univariate analysis ($p < 0.2$). Potential confounders such as treatments or disease activity were not included in the models because of concerns regarding timing, dosing and study design. Different models were built using the all possible equations approach and the final models were chosen according to the Akaike information criterion and the area under the ROC curve after assessing possible first order interactions.

Exploratory analysis, including the association between Anti-FCS-IgA and RA-ILD, and the unadjusted assessment of the overlap between antibodies and the association between Anti-CarP and smoking were performed in the main population.

There was only one observation missing for HAQ in the main population which was imputed using the average HAQ values in the respective group.

Two-tailed p values < 0.05 were established to be statistical significance in all analyses, which were performed using both IBM SPSS for Windows V.23.0 and STATA V.15.

Ethics

Signed informed consent was obtained from all patients before study enrolment. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology guidelines were followed.

RESULTS

Study population baseline features

One hundred and seventy-nine patients were enrolled in the main population: 31 in the RA-ILD group and 148 in the non-ILD group. The diagnostic work-up resulted in six new ILD diagnoses: these patients were relocated to the RA-ILD (see figure 1). Thus, 37 patients (21%) were finally included in the

Rheumatoid arthritis

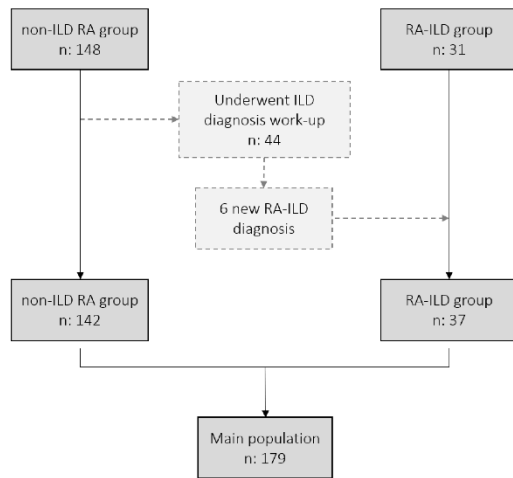


Figure 1 Main population flow chart. ILD, interstitial lung disease; RA, rheumatoid arthritis.

RA-ILD group and 142 in the non-ILD RA group. The replication sample was composed of 25 patients with RA-ILD and 50 RA patients without ILD. The baseline features of the main population and the replication sample are summarised in table 1 and online supplementary table S1, respectively.

In the main population, RA-ILD patients had a mean age at ILD diagnosis of 64.2 (± 9.7) years and a mean time from RA diagnosis to ILD diagnosis of 8.5 (± 7.4) years. Usual interstitial pneumonia (38%) and non-specific pneumonia (38%) were the most frequent ILD patterns, followed by respiratory bronchiolitis-associated ILD (11%), cryptogenic organised pneumonia (8%) and desquamative interstitial pneumonia (5%).

Subjects within the RA-ILD group were older and had a longer disease duration than their counterparts at inclusion ($p < 0.005$) as well as greater disease activity (DAS28 3.71 (± 1.35) vs 2.74

(± 1.05), $p < 0.005$), a higher proportion of erosive disease (70% vs 44%, $p < 0.005$) and functional disability (HAQ-DI ≥ 1 ; 27% vs 12%, p value: 0.02). No differences in current (19% vs 16%, p value: 0.69) and ever-smoking (57% vs 44%, p value: 0.15) were observed, although patients with RA-ILD had a higher smoking cumulative dose (30.7 (± 11.1) vs 21.8 (± 12.0) packs/year, $p < 0.005$). No between-group differences in the proportions of current csDMARDs (89% vs 86%, p value: 0.60), bDMARDs (30% vs 25%, p value: 0.59) or glucocorticoids (70% vs 58%, p value: 0.17) were observed.

Anti-CarP and RA-ILD

The proportions of positive Anti-CarP in the main population were 49%, 56%, 23% and 27% for Anti-FCS, Anti-Fib, Anti-CFFHP and Anti-FCS-IgA, respectively. All Anti-CarP fine specificities were more frequent in the RA-ILD group (Anti-FCS: 70% vs 43%; Anti-Fib: 73% vs 51%; Anti-CFFHP: 38% vs 19%; Anti-FCS-IgA: 51% vs 20%, $p < 0.05$ for all comparisons) (table 2). Similar results were observed in the replication sample (Anti-FCS: 92% vs 48%, $p < 0.005$; Anti-Fib: 76% vs 58%, p value: 0.12; Anti-CFFHP: 36% vs 18%, p value: 0.08).

In addition, the mean titers were higher in the RA-ILD group, ranging from approximately 1.3 for Anti-Fib to nearly fourfold for Anti-CFFHP; the differences were statistically significant for Anti-FCS, Anti-CFFHP and Anti-FCS-IgA (figure 2A–C,F).

A logistic regression model adjusted for age, RA disease duration, ACPA, RF, sex and smoking cumulative dose showed that Anti-FCS (OR: 3.42; 95% CI: 1.13 to 10.40), Anti-CFFHP (OR: 3.12; 95% CI: 1.06 to 9.14) and Anti-FCS-IgA (OR: 4.30; 95% CI: 1.41 to 13.04) were independently associated with ILD. The results of the analysis for Anti-Fib (OR: 2.85; 95% CI: 0.83 to 9.71) followed a similar trend, although not significant. This tendency was confirmed in the replication sample; Anti-FCS (OR: 10.42; 95% CI: 1.68 to 64.46); Anti-Fib (OR: 1.65; 95% CI: 0.40 to 6.86) and Anti-CFFHP (OR: 1.49; 95% CI: 0.42 to 5.29) (table 3).

Table 1 Main population demographic, clinical and therapeutic features

	Main population, n: 179	RA-ILD, n: 37	Non-ILD RA, n: 142	P value
Female (%)	141 (79)	25 (68)	116 (82)	NS
Age mean (\pm SD)	59.7 (13.0)	67.3 (10.1)	57.7 (12.9)	<0.005
Mean disease duration (\pm SD)	6.6 (5.0)	11.6 (7.1)	5.3 (13.3)	<0.005
Current smokers (%)	30 (17)	7 (19)	23 (16)	NS
Ever smokers (%)	83 (46)	21 (57)	62 (44)	NS
Smoking cumulative dose (\pm SD)	24.1 (13.0)	30.7 (11.1)	21.8 (12.0)	<0.005
Caucasian (%)	151 (84)	31 (84)	120 (85)	NS
Other EAMs				
Sicca syndrome (%)	33 (18)	8 (22)	25 (18)	NS
Rheumatoid nodules (%)	21 (12)	7 (19)	14 (10)	NS
Serositis (%)	3 (2)	1 (3)	2 (1)	NS
Treatment				
Glucocorticoids (%)	108 (60)	26 (70)	82 (58)	NS
csDMARDs (%)	155 (87)	33 (89)	132 (86)	NS
MTX (%)	115 (64)	20 (54)	95 (67)	NS
bDMARDs (%)	47 (26)	11 (30)	36 (25)	NS
Mean DAS28 (\pm SD)	2.94 (1.18)	3.71 (1.35)	2.74 (1.05)	<0.005
Erosive disease (%)	89 (50)	26 (70)	63 (44)	<0.005
Mean HAQ-DI (95% CI)	0.39 (0.32 to 0.46)	0.69 (0.53 to 0.85)	0.31 (0.24 to 0.38)	<0.005
Functional disability HAQ-DI ≥ 1 (%)	27 (15)	10 (27)	17 (12)	0.024

bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs; csDMARDs, conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; DAS28, Disease Activity Score in 28 joints; EAMs, extra-articular manifestations; HAQ-DI, Health Assessment Questionnaire Disability Index; ILD, interstitial lung disease; MTX, methotrexate; NS, not significant; RA, rheumatoid arthritis.

Rheumatoid arthritis

Table 2 Main population autoantibody status in patients with and without ILD

	Main population, n: 179	RA-ILD, n: 37	Non-ILD RA, n: 142	P value
ACPA positive (%)	128 (72)	29 (78)	99 (70)	NS
Median titer ACPA (IQR) CU	222 (1341)	674 (2215)	143 (1132)	NS
RF positive (%)	111 (62)	28 (76)	83 (59)	NS
Median titer RF (IQR) IU	40 (182)	105 (298)	34 (110)	NS
Anti-FCS positive (%)	87 (49)	26 (70)	61 (43)	<0.005
Median titer Anti-FCS (IQR) AU/mL	168 (354)	332 (1700)	136 (304)	<0.005
Anti-Fib positive (%)	100 (56)	27 (73)	73 (51)	0.019
Median titer Anti-Fib (IQR) AU/mL	186 (305)	281 (357)	175 (277)	NS
Anti-CFFHP positive (%)	41 (23)	14 (38)	27 (19)	0.015
Median titer Anti-CFFHP (IQR) AU/mL	16 (131)	33 (834)	14 (115)	0.030
Anti-FCS-IgA positive (%)	48 (27)	19 (51)	29 (20)	<0.005
Median titer Anti-FCS-IgA (IQR) AU/mL	102 (285)	258 (528)	79 (222)	<0.005

ACPA, anticitrullinated protein antibody; Anti-CFFHP, IgG antibodies against chimeric fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS, IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-FCS-IgA, IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib, IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; AU, arbitrary units; CFFHP, chimeric fibrin/filaggrin homocitrullinated peptide; CU, chemiluminescence units; ILD, interstitial lung disease; IU, international units; NS, not significant; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor.

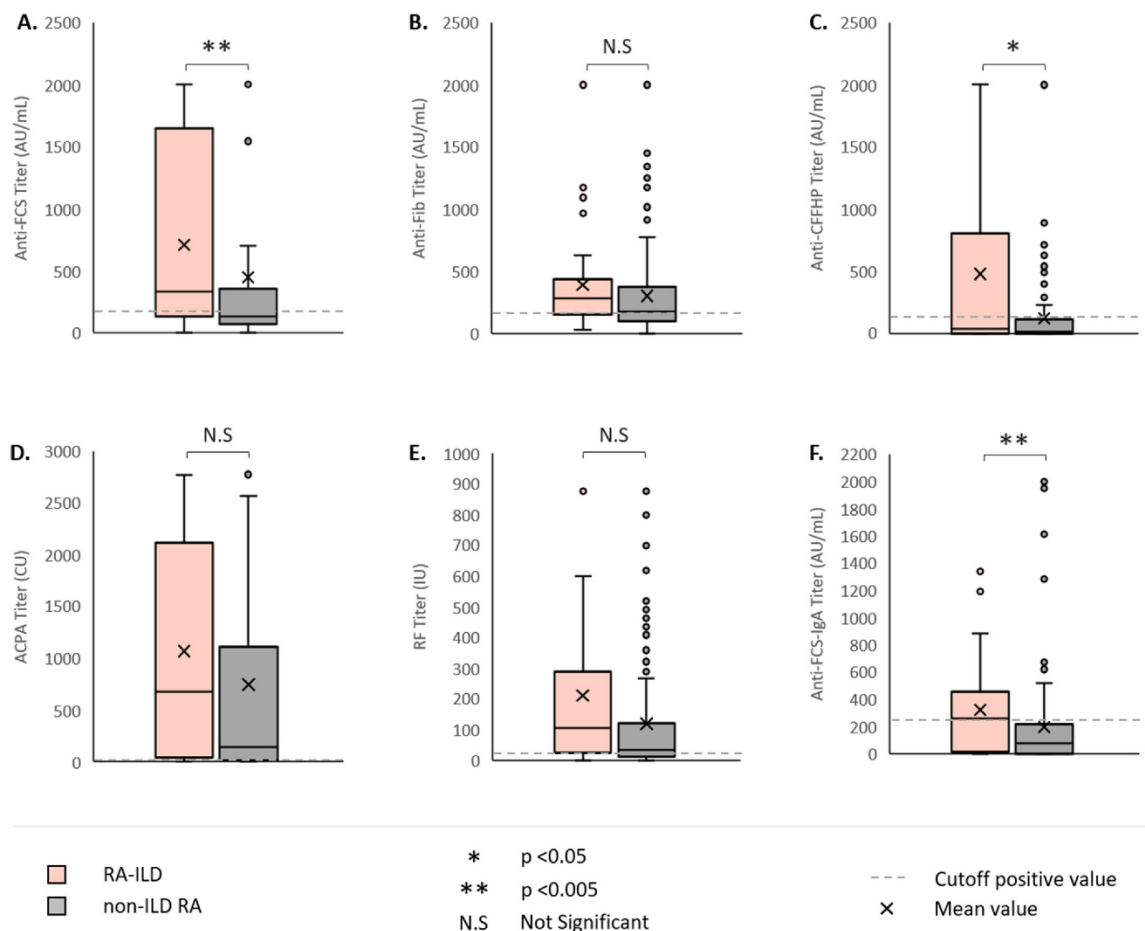


Figure 2 Boxplots of autoantibody titers in patients with and without ILD. ACPA, anticitrullinated protein antibody; Anti-CFFHP, IgG antibodies against chimeric fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS, IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib, IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; Anti-FCS-IgA, IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum immunoglobulin A; AU, arbitrary units; CU, chemiluminescence units; ILD, interstitial lung disease; IU, international units; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor.

Table 3 Logistic regression models for the association between Anti-CarP specificities with RA-ILD

	Main population			Replication sample		
	OR	p> z	95% CI	OR	p> z	95% CI
Anti-FCS	3.421	0.030	1.125 to 10.404	10.419	0.012	1.684 to 64.459
Age	1.068	0.008	1.017 to 1.120	1.045	0.211	0.974 to 1.122
RA disease duration	1.291	0.000	1.161 to 1.436	0.989	0.708	0.933 to 1.047
ACPA	0.525	0.300	0.155 to 1.775	0.708	0.809	0.043 to 11.624
RF	2.016	0.246	0.616 to 6.596	5.080	0.080	0.823 to 31.330
Sex	0.492	0.201	0.166 to 1.459	3.594	0.128	0.692 to 18.670
Smoking cumulative dose	1.023	0.145	0.992 to 1.055	0.962	0.061	0.923 to 1.001
Anti-Fib	2.846	0.095	0.834 to 9.708	1.649	0.491	0.396 to 6.856
Age	1.070	0.006	1.020 to 1.123	1.047	0.142	0.984 to 1.115
RA disease duration	1.276	0.000	1.147 to 1.420	0.983	0.518	0.934 to 1.034
ACPA	0.618	0.427	0.188 to 2.026	1.768	0.641	0.160 to 19.419
RF	1.688	0.431	0.459 to 6.212	5.613	0.056	0.956 to 32.952
Sex	0.475	0.179	0.160 to 1.408	2.406	0.229	0.575 to 10.066
Smoking cumulative dose	1.026	0.089	0.996 to 1.057	0.969	0.083	0.935 to 1.004
Anti-CFFHP	3.115	0.039	1.061 to 9.138	1.494	0.534	0.421 to 5.291
Age	1.058	0.016	1.010 to 1.107	1.046	0.147	0.984 to 1.113
RA disease duration	1.285	0.000	1.157 to 1.426	0.985	0.586	0.937 to 1.037
ACPA	0.494	0.268	0.142 to 1.720	1.868	0.605	0.174 to 19.948
RF	2.617	0.104	0.819 to 8.357	6.231	0.037	1.113 to 34.888
Sex	0.382	0.092	0.124 to 1.171	2.030	0.321	0.501 to 8.215
Smoking cumulative dose	1.023	0.143	0.992 to 1.055	0.971	0.126	0.937 to 1.008

ACPA, anticitrullinated protein antibody; Anti-CarP, anti-carbamylated protein antibodies; Anti-CFFHP, IgG antibodies against chimeric fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS, IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib, IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; ILD, interstitial lung disease; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor.

ACPA, RF and RA-ILD

No differences were found in the proportion of patients who tested positive for ACPA (78% vs 70%, p value: 0.29) or RF (76% vs 59%, p value: 0.06) according to ILD status. Numerically higher titers of both antibodies (median (IQR), 674 (2215) vs 143 (1132) CU, p value: 0.07) and (105 (298) vs 34 (110) IU, p value: 0.06) ACPA and RF, respectively) were observed in the RA-ILD group (see table 2 and figure 2D,E), although statistical significance was not reached.

Overlap between Anti-CarP with ACPA and RF

The overlap between Anti-CarP specificities in ACPA and RF positive patients is shown in table 4. Among those patients negative to both RF and ACPA, a small subset of positive Anti-FCS (9%), Anti-Fib (14%), Anti-CFFHP (3%) and Anti-FCS-IgA (6%) was observed. ACPA and RF titers were significantly higher in patients seropositive for Anti-FCS, Anti-Fib, Anti-CFFHP and Anti-FCS-IgA (p<0.005 for all comparisons).

Anti-CarP and smoking

Numerically higher proportions of all Anti-CarP were observed in ever and current smokers, although the difference was only significant for Anti-FCS (58% vs 41% and 67% vs 45%, respectively), Anti-Fib (65% vs 48% and 77% vs 52%, respectively) and Anti-FCS-IgA (37% vs 18% and 50% vs 22%), p<0.05 for all comparisons. No differences in the smoking cumulative dose according to the Anti-CarP status were observed. Details in the unadjusted association between Anti-CarP and smoking are provided in online supplementary table S2 and S3.

DISCUSSION

This is the first study to analyse the association between Anti-CarP and RA-ILD. We found higher proportions and titers up to nearly fourfold greater of different Anti-CarP specificities in the RA-ILD group when compared with patients without this lung involvement. All Anti-CarP showed a consistent effect towards

Table 4 Overlap between Anti-CarP specificities with ACPA and RF in the main population

	Anti-FCS		Anti-Fib		Anti-CFFHP		Anti-FCS-IgA	
	Positive n: 87	Negative n: 92	Positive n: 100	Negative n: 79	Positive n: 41	Negative n: 138	Positive n: 48	Negative n: 131
ACPA Positive, n: 128	76 (59%)	52 (41%)	85 (66%)	43 (33%)	40 (31%)	88 (69%)	43 (34%)	85 (66%)
Negative, n: 51	11 (22%)	40 (78%)	15 (29%)	36 (71%)	1 (2%)	50 (98%)	5 (10%)	46 (90%)
Median titer (IQR) CU	760 (2034)	26 (473)	732 (2062)	28 (415)	994 (2278)	75 (929)	154 (313)	12 (167)
RF Positive, n: 111	71 (64%)	40 (36%)	87 (78%)	24 (22%)	32 (29%)	79 (71%)	45 (41%)	66 (59%)
Negative, n: 68	16 (24%)	52 (76%)	13 (19%)	55 (81%)	9 (13%)	59 (87%)	3 (4%)	65 (96%)
Median titer (IQR) IU	102 (260)	18 (48)	115 (261)	12 (24)	105 (190)	32 (117)	184 (336)	0 (93)

ACPA, anticitrullinated protein antibody; Anti-CFFHP, IgG antibodies against chimeric fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS, IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-FCS-IgA, IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum immunoglobulin A; Anti-Fib, IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; CU, chemiluminescence units; IU, international units; RF, rheumatoid factor.

Rheumatoid arthritis

increasing the odds of ILD, even after adjustment for pertinent confounders using logistic regression modelling.

Compared with the general population, RA entails a 50% higher risk of mortality.¹⁷ Over the past two decades, the mortality rate has declined, mostly due to a reduction in deaths related to cardiovascular disease and malignancies,^{18 19} possibly attributed to an earlier diagnosis and treat-to-target strategies. Conversely, incident deaths from pulmonary disease have remained stable¹⁹ and may become the leading cause of death in RA patients. RA-ILD plays a major role in the burden of pulmonary-related deaths and constitutes an unmet need, even with available treatment options. RA-ILD patients usually have greater comorbidity and a higher incidence of infection, reflected by a higher mortality^{2 20 21} and a greater disability. Therefore, early detection is crucial in establishing an individualised treatment strategy.

Various novel candidates have been proposed for RA-ILD screening, including imaging techniques such as positron emission tomography and pulmonary ultrasound,^{22 23} or serum biomarkers such as the matrix metalloproteinases 7, surfactant protein D and Krebsvon del Lungen-6.^{4 5} RA-ILD has been associated with different antimodified protein antibodies (AMPAs) based on citrulline^{24 25} and more recently, malondialdehyde-acetaldehyde adducts.²⁶ Screening techniques can increase RA-ILD diagnostic accuracy, although a model based on features used in clinical practice such as age, sex, smoking, RF and ACPA has a potent screening capacity for symptomatic and subclinical RA-ILD.⁴ Based on these findings, we decided to include these features in addition to RA disease duration as adjusting variables in our models.

The relationship between ACPA and ILD has been addressed in different studies with most showing a higher seroprevalence and titers in RA-ILD cohorts.^{1 27-29} However, no association between ACPA and RA-ILD has been confirmed in other cohorts^{30 31} and up to 17% of patients with RA-ILD are reported to be ACPA-negative.²⁰ In a recent meta-analysis, ACPA positivity was associated with a higher risk for ILD (OR: 4.7, 95% CI: 2.1 to 10.6) although a single study contributed almost 75% to the weighted average and was not specifically concerned with RA-ILD.²⁹ We found that ACPA and RF were numerically higher in patients with ILD, but the differences were not significant, unlike Anti-CarP.

The association between Anti-CarP and RA-ILD observed in the main population and the replication sample opens a debate on the potential role of homocitrullination (carbamylation) and its antibody response on its development. So far, no studies have evaluated homocitrulline in lung tissue of RA patients as opposed to citrulline.³² However, carbamylated peptides have been detected in the synovial of RA patients³³ and lung tissue from smokers and asthma patients.^{34 35} Interestingly, Anti-CarP have been found in subjects with bronchiectasis, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease with no smoking or RA history.^{11 12}

Carbamylation can change the structure, function and antibody antigen binding avidity of a wide range of proteins.³⁶ Thus, Anti-CarP may target homocitrullinated peptides found in the lung and promote a subsequent inflammatory response, which is essential in the genesis and progression of ILD.^{37 38} An alternative explanation is a direct pulmonary insult by the inflammatory cascade precipitated by an increased sensitivity of proteinases and the presence of free radicals and other inflammatory mediators enhanced by carbamylated free amino acids found in the lung.³⁶ Notably, the association between ILD and Anti-CarP-IgA presented the greatest effect size, fuelling the hypothesis that RA-related antibodies originate in the respiratory mucosa.³⁹

Although ACPA and Anti-CarP present important differences in their genetic⁴⁰ and environmental⁴¹ backgrounds, both antibody systems form part of the AMPA family and have great structural similarity.³⁶ As in previous studies,^{8 9} a substantial overlap between autoantibodies was observed in our cohort. However, inhibition studies and the fact that a subset of ACPA negative patients can harbour Anti-CarP (up to 29% in our population) support the hypothesis that the overlap is only partial.^{7 42} Recent evidence indicates that exposure to a purified specific PTM such as homocitrulline, acetaldehyde or citrulline can induce AMPAs against antigens containing other PTMs.⁴³ Hence, a single PTM can generate a breaking of tolerance against multiple modified antigens.

Smoking, the leading environmental risk factor for RA and RA-ILD is also a known risk factor for breaking tolerance against multiple modified antigens.⁴⁴ Smoking can induce carbamylation directly by inhalation of thiocyanate or via myeloperoxidase release by neutrophils at inflammation sites.^{8 34 36} Like a previous study,⁴⁴ we found a higher seroprevalence of Anti-CarP among smokers. There were no between-group differences in ever or current smoking according to the presence of ILD, yet a higher smoking cumulative dose was observed. No interaction between the smoking cumulative dose and Anti-CarP specificities was observed in the regression models, suggesting that the association between Anti-CarP and ILD is not a simple surrogate marker for smoking.

Our study has some limitations. First, a relatively small proportion of patients with RA-ILD was included, so we had to be conservative while building our models because of the risk of overfitting, so residual confounding cannot be ruled-out. Treatment and disease activity were not included; the former due to concerns about the accuracy of timing and dosing and current literature's inability to validate a true relationship between RA-ILD and methotrexate⁴⁵ or bDMARDs.⁴⁶⁻⁴⁸ The latter, because of the design of the study with only a single measurement, which has not shown to be relevant in previous reports,^{49 50} as opposed to its longitudinal evaluation.⁵¹ Likewise, we cannot rule-out subclinical RA-ILD in the control group, mainly due to the lack of a universally accepted evidence-based screening approach. Finally, most of our patients are of Mediterranean Caucasian origin, which has been associated with a less aggressive RA course and a lower prevalence of extra-articular disease.⁵²

In conclusion, a robust association between different Anti-CarP and RA-ILD was found after adjusting for multiple confounders including ACPA and RF. These findings pose the debate whether a link between homocitrullination and the development of this devastating extra-articular manifestation exists. However, our results should be interpreted with caution and further studies validating our findings are needed.

Correction notice This article has been corrected since it published Online First. The second affiliation has been updated.

Twitter Raul Castellanos-Moreira @raul_cast_morei and Sebastian Cruz Rodríguez-García @sdlcrodriguez

Acknowledgements The authors wish to thank Loreto Carmona and Miguel Angel Descalzo for their assistance in the methodology and the Interstitial Lung Disease Committee staff at the Hospital Clinic of Barcelona for their collaboration.

Contributors RC-M, SCR-G, IH and RS contributed to the conception and study design. RC-M, JR, JG-P, VR-E, IC-S, SH and JDC contributed to data collection. RC-M, SCR-G and MJG analysed the data. RC-M, SCR-G, VR-E and IH contributed to interpretation of the data. RC-M, SCR-G and RS wrote the first version of the manuscript and AC, JR, JG-P, JDC, VR-E, IC-S, SH and IH revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Financial support from the Hospital Clinic of Barcelona, Research, Innovation and Education Department (Grant # 37 933 to RC-M and the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and the European Regional Development Fund (Grant # RTI2018-094120-B-I00 to IH).

Competing interests None declared.

Patient and public involvement Patients and/or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of this research.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Committee (approval number 2017/0679).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available upon reasonable request. Data is available upon reasonable request, all data relevant to the study are included in the article.

ORCID iDs

Raul Castellanos-Moreira <http://orcid.org/0000-0002-4104-4101>
 Sebastian Cruz Rodríguez-García <http://orcid.org/0000-0002-7773-151X>

REFERENCES

- Duarte A, Porter J, Leandro M. The lung in a cohort of rheumatoid arthritis patients—an overview of different types of involvement and treatment. *Rheumatology* 2019;1:2031–8.
- Hyltdgaard C, Hilberg O, Pedersen AB, et al. A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: comorbidity and mortality. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1700–6.
- Spagnolo P, Lee JS, Sverzellati N, et al. The lung in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:1544–54.
- Doyle TJ, Patel AS, Hatabu H, et al. Detection of rheumatoid Arthritis-Interstitial lung disease is enhanced by serum biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:1403–12.
- Kinoshita F, Hamano H, Harada H, et al. Role of KL-6 in evaluating the disease severity of rheumatoid lung disease: comparison with HRCT. *Respir Med* 2004;98:1131–7.
- Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007;13:1176–84.
- Shi J, Knevel R, Suwannalai P, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:17372–7.
- Truchetet M-E, Dublanc S, Barnetche T, et al. Association of the presence of Anti-Carbamylated protein antibodies in early arthritis with a poorer clinical and radiologic outcome: data from the French ESPOIR cohort. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:2292–302.
- Humphreys JH, Verheul MK, Barton A, et al. Anticarbamylated protein antibodies are associated with long-term disability and increased disease activity in patients with early inflammatory arthritis: results from the Norfolk arthritis register. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1139–44.
- Vidal-Bralo L, Perez-Pampin E, Regueiro C, et al. Anti-carbamylated protein autoantibodies associated with mortality in Spanish rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* 2017;12:e0180144.
- Janssen KJM, de Smit MJ, Brouwer E, et al. Rheumatoid arthritis-associated autoantibodies in non-rheumatoid arthritis patients with mucosal inflammation: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2015;17:174.
- Verheul MK, van Erip SJH, van der Woude D, et al. Anti-carbamylated protein antibodies: a specific hallmark for rheumatoid arthritis. Comparison to conditions known for enhanced carbamylation; renal failure, smoking and chronic inflammation. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1575–6.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, et al. An official American thoracic Society/ European respiratory Society statement: update of the International multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:733–48.
- Pérez ML, Gómará MJ, Ercilla G, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2007;50:3573–84.
- Malakoutikhah M, Gómará MJ, Gómez-Puerta JA, et al. The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2011;54:7486–92.
- van der Woude D, Rantapää-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, et al. Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1554–61.
- Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combesure C, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2013;80:29–33.
- Zhang Y, Lu N, Peloquin C, et al. Improved survival in rheumatoid arthritis: a general population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* 2017;76:408–13.
- Abhishek A, Nakafero G, Kuo C-F, et al. Rheumatoid arthritis and excess mortality: down but not out. A primary care cohort study using data from clinical practice research Datalink. *Rheumatology* 2018;57:977–81.
- Solomon JJ, Chung JH, Cosgrove GP, et al. Predictors of mortality in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2016;47:588–96.
- Zamora-Legoff JA, Krause ML, Crowson CS, et al. Risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Rheumatol* 2016;35:2585–9.
- Uehara T, Takeno M, Hama M, et al. Deep-inspiration breath-hold 18F-FDG-PET/CT as assessment of connective tissue disease associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol* 2016;26:121–7.
- Xie HQ, Zhang WW, Sun DS, et al. A simplified lung ultrasound for the diagnosis of interstitial lung disease in connective tissue disease: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2019;21.
- Harlow L, Rosas IO, Gochuico BR, et al. Identification of citrullinated Hsp90 isoforms as novel autoantigens in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2013;65:869–79.
- Alunno A, Bistoni O, Pratesi F, et al. Anti-citrullinated alpha enolase antibodies, interstitial lung disease and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2018;57:850–5.
- England BR, Duryee MJ, Roul P, et al. Malondialdehyde-Acetaldehyde adducts and antibody responses in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1483–93.
- Kelly CA, Saravanan V, Nisar M, et al. Rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: associations, prognostic factors and physiological and radiological characteristics—a large multicentre UK study. *Rheumatology* 2014;53:1676–82.
- Giles JT, Danoff SK, Sokolove J, et al. Association of fine specificity and repertoire expansion of anticitrullinated peptide antibodies with rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1487–94.
- Zhu J, Zhou Y, Chen X, et al. A metaanalysis of the increased risk of rheumatoid arthritis-related pulmonary disease as a result of serum anticitrullinated protein antibody positivity. *J Rheumatol* 2014;41:1282–9.
- Inui N, Enomoto N, Suda T, et al. Anti-Cyclic citrullinated peptide antibodies in lung diseases associated with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2008;41:1074–7.
- Skare TL, Nakano I, Escuissato DL, et al. Pulmonary changes on high-resolution computed tomography of patients with rheumatoid arthritis and their association with clinical, demographic, serological and therapeutic variables. *Rev Bras Reumatol* 2011;51:325–30.
- Ytterberg AJ, Joshua V, Reynisdottir G, et al. Shared immunological targets in the lungs and joints of patients with rheumatoid arthritis: identification and validation. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1772–7.
- Turunen S, Huhtakangas J, Nousiainen T, et al. Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res Ther* 2016;18:239.
- Lugli EB, Correia RESM, Fischer R, et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:9.
- Wang Z, DiDonato JA, Buffa J, et al. Eosinophil peroxidase catalyzed protein carbamylation participates in asthma. *J Biol Chem* 2016;291:22118–35.
- Shi J, van Veelen PA, Mahler M, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev* 2014;13:225–30.
- Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:287–302.
- Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy* 2018;14:221–32.
- Solomon JJ, Matson S, Kelmenson LB, et al. Iga antibodies directed against citrullinated protein antigens are elevated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *CHEST* 2020.
- Jiang X, Trouw LA, van Wesemael TJ, et al. Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1761–8.
- Janssen KJM, de Smit MJ, Brouwer E, et al. Rheumatoid arthritis-associated autoantibodies in non-rheumatoid arthritis patients with mucosal inflammation: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2015;17:174.
- Shi J, Willemze A, Janssen GMC, et al. Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the ‘AMC-Senshu’ method. *Ann Rheum Dis* 2013;72:148–50.
- Kampstra ASB, Dekkers JS, Volkov M, et al. Different classes of anti-modified protein antibodies are induced on exposure to antigens expressing only one type of modification. *Ann Rheum Dis* 2019;78:908–16.
- van Wesemael TJ, Ajeganova S, Humphreys J, et al. Smoking is associated with the concurrent presence of multiple autoantibodies in rheumatoid arthritis rather than with anti-citrullinated protein antibodies per se: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther* 2016;18:285.

Rheumatoid arthritis

- 45 Fragoulis GE, Conway R, Nikiphorou E. Methotrexate and interstitial lung disease: controversies and questions. A narrative review of the literature. *Rheumatology* 2019;58:1900–6.
- 46 Herrinton LJ, Harrold LR, Liu L, et al. Association between anti-TNF- α therapy and interstitial lung disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2013;22:394–402.
- 47 Theander L, Nyhäll-Wåhlin B-M, Nilsson Jan-Åke, et al. Severe Extraarticular manifestations in a community-based cohort of patients with rheumatoid arthritis: risk factors and incidence in relation to treatment with tumor necrosis factor inhibitors. *J Rheumatol* 2017;44:981–7.
- 48 Curtis JR, Sarsour K, Napalkov P, et al. Incidence and complications of interstitial lung disease in users of tocilizumab, rituximab, abatacept and anti-tumor necrosis factor α agents, a retrospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2015;17:319.
- 49 Koduri G, Norton S, Young A, et al. Interstitial lung disease has a poor prognosis in rheumatoid arthritis: results from an inception cohort. *Rheumatology* 2010;49:1483–9.
- 50 Restrepo JF, del Rincón I, Battafarano DF, et al. Clinical and laboratory factors associated with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2015;34:1529–36.
- 51 Sparks JA, He X, Huang J, et al. Rheumatoid arthritis disease activity predicting incident clinically apparent rheumatoid Arthritis–Associated interstitial lung disease: a prospective cohort study. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1472–82.
- 52 Carmona L, González-Alvaro I, Balsa A, et al. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis* 2003;62:897–900.

Anti-CarP home-made ELISA technique

To detect IgG or IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum (Anti-FCS and Anti-FCS-IgA, respectively) and IgG fibrinogen (Anti-Fib), an ELISA assay using both carbamylated FCS and Fib with non-modified FCS or Fib as antigens was developed. FCS and Fib were carbamylated by incubating a 4mg/ml concentration for FCS or 2mg/ml for Fib with 1M of KCNO (or with 1M of KCl for the controls) for 15 hours at 37°C. After incubation, the samples were desalted by centrifugation (Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter units, Merck). Carbamylation efficiency was assessed by amino acid analysis of the hydrolysed samples in a Biochrom 30 amino acid analyser (Biokrom, UK) using L-Norleucine as the internal standard. The conversion of Lys to homocitrulline was determined as the fraction of the total amount of amino acids.

Anti-FCS and Anti-Fib were determined by ELISA. All samples were assayed on separate plates (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Denmark) coated with FCS or Fib carbamylated and non-modified as antigens overnight at a concentration of 10 µg/mL of carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M pH 9.6). Diluted serum samples (1:50 in PBS-1% BSA-0.05% Tween) were incubated overnight at 4°C and IgG or IgA antibodies detected using goat anti-human IgG-AP or a rabbit anti-human serum IgA-AP (Jackson Immunoresearch Europe, UK) and SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate as substrate. Chimeric Fibrin/Filaggrin Homocitrullinated peptide (CFFHP): [HCit620,625] α-fibrin(617-631)-S306, S319 cyclo [Cys306,319, HCit312]filaggrin (304-324) and its non-homocitrullinated version were synthesized by solid-phase peptide synthesis as C-terminal carboxamides on a Novasyn TGR resin (Novabiochem Merck, Germany) following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy with subsequent cyclization in solution by forming a disulfide bridge (1-2).

To determine IgG antibodies against CFFHP (Anti-CFFHP) home-made ELISA assays were performed. Firstly, CFFHP and non-homocitrullinated peptide as a control for homocitrulline specificity were coupled covalently to the microplates (Nunc Immobilizer)

diluted to 10 µg/mL in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer. 100 µL of peptide solution was added to each microplate well and incubated overnight at 4°C. Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample and the peptide in order to estimate the background reading. After incubation, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer for 1 hour at room temperature. Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% vol/vol Triton X-100, 0.5% wt/vol Na-deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 10% foetal bovine serum; 100 µL/well was added and incubated for 1.5 hours at room temperature. After washing 6 times with PBS/0.05% Tween-20, 100 µL/well of the anti-human secondary IgG antibody conjugated to peroxidase in RIA buffer was added and bound antibodies were detected using SIGMAFAST with o-phenylenediamine dihydrochloride as substrate.

Reactivity to non-homocitrullinated FCS, Fib and CFFHP peptide was subtracted from the reactivity to homocitrullinated FCS, Fib and CFFHP. A series of successive dilutions of a pool of sera from four positive patients was used as a reference standard in all plates and to convert optical density values to arbitrary units (AU). ROC curve analysis and regression analysis were conducted using the GraphPad Prism5 program and the cut-off values were determined with a specificity of 95% compared with a healthy population of blood donors (n=179). A positive cut-off value was defined as ≥ 173.5 AU/mL, ≥ 166.9 AU/mL, ≥ 146.5 AU/mL and ≥ 257.0 AU/ml for Anti-FCS, Anti-Fib, Anti-CFFHP and Anti-FCS-IgA respectively. The magnitude of the reactivity against FCS-CarP and Fib-CarP vs. native proteins rendered differences in OD values higher than 0.2 and 0.8, respectively; these differences were lower for the chimeric carbamylated peptide (>0.1). A test was only considered positive and specific for homocitrulline when the UA/mL values were higher than the respective cut-off and the OD difference between carbamylated (homocitrullinated) and native (non-homocitrullinated) antigens was at least 0.1, in

agreement with the methodology previously reported by van der Woude et al. for citrullinated peptide antigens (3).

References

1. Perez ML, Gomara MJ, Ercilla G, *et al.* Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2007;50:3573–84. DOI:10.1021/jm0701932
2. Malakoutihak M, Gómara MJ, Gómez-Puerta JA, *et al.* The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2011;54:7486–92. DOI:10.1021/jm200563u
3. van der Woude D, Rantapää-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1554–61. DOI: 10.1136/ard.2009.124537

TABLES – SUPPLEMENTARY MATERIAL

TABLE S1. Demographic, clinical and serological features according to the presence of ILD in the replication sample

	Replication sample n:75	RA-ILD n:25	Non-ILD RA n:50	p value
Female (%)	40 (53)	14 (56)	26 (52)	NS
Mean age (±SD)	66.7±8.8	68.6±10.5	65.7±7.6	NS
Mean disease duration (±SD)	8.7±11.1	8.4±9.5	8.9±11.9	NS
Smoking cumulative dose (±SD)	19.8±20.1	14.3±20.0	22.6±19.7	NS
Erosive disease (%)	40 (53)	15 (60)	25 (50)	NS
ACPA (%)	65 (87)	24 (96)	41 (82)	NS
Median titer ACPA (IQR) CU	250 (324)	250 (308)	250 (367)	NS
RF (%)	52 (69)	23 (92)	29 (58)	<0.005
Median titer RF (IQR) IU	83 (284)	165 (559)	38 (194)	<0.005
Anti-FCS (%)	47 (63)	23 (92)	24 (48)	<0.005
Median titer Anti-FCS (IQR) AU/mL	545 (1875)	1571 (1316)	171 (977)	<0.005
Anti-Fib (%)	48 (64)	19 (76)	29 (58)	NS
Median titer Anti-Fib (IQR) AU/mL	282 (335)	407 (418)	225 (277)	0.028
Anti-CFFHP (%)	18 (24)	9 (36)	9 (18)	NS
Median titer Anti-CFFHP (IQR) AU/mL	0 (118)	0 (598)	0 (54)	NS

ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; RF: rheumatoid factor; Anti-FCS: IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib: IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; Anti-CFFHP: IgG antibodies against carbamylated fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; IQR: interquartile range; CU: chemiluminescence units; IU: international units; AU: arbitrary unit; ±SD: standard deviation; NS: Not significant.

TABLE S2. Anti-CarP positivity according to the smoking status in the main population

		Anti-FCS		Anti-Fib		Anti-CFFHP		Anti-FCS-IgA	
		positive n (%)	p value	positive n (%)	p value	positive n (%)	p value	positive n (%)	p value
Smoking status	Ever n: 83	48 (58)	0.022	54 (65)	0.021	22 (27)	NS	31 (37)	0.003
	Non-ever n: 96	39 (41)		46 (48)		19 (20)		17 (18)	
	Current n: 30	20 (67)	0.030	23 (77)	0.012	5 (17)	NS	15 (50)	0.002
	Non-current n: 149	67 (45)		77 (52)		36 (24)		33 (22)	

Anti-FCS: IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib: IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; Anti-CFFHP: IgG antibodies against carbamylated fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS-IgA: IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum; NS: not significant.

TABLE S3. Smoking cumulative dose according to Anti-CarP positivity in the main population

	Anti-FCS			Anti-Fib			Anti-CFFHP			Anti-FCS-IgA		
	positive n: 48	negative n: 35	p value	positive n: 54	negative n: 29	p value	positive n: 22	negative n: 61	p value	positive n: 31	negative n: 52	p value
Mean smoking cumulative dose (±SD)	25.1±12.9	22.6±13.4	NS	24.2±12.9	23.8±13.4	NS	25.3±10.8	23.6±13.8	NS	26.0±12.7	22.9±13.2	NS

Anti-FCS: IgG antibodies against carbamylated fetal calf serum; Anti-Fib: IgG antibodies against carbamylated fibrinogen; Anti-CFFHP: IgG antibodies against carbamylated fibrine/filagrine homocitrullinated peptide; Anti-FCS-IgA: IgA antibodies against carbamylated fetal calf serum; ±SD: standard deviation; NS: not significant

Resumen del tercer trabajo

La EPI es una manifestación extraarticular grave de la AR, que afecta entre el 3-50% de los pacientes según el método de detección utilizada y la población examinada. La EPI-AR presenta una tasa de mortalidad hasta 10 veces mayor que la de los pacientes sin EPI, lo que ha generado un gran esfuerzo para lograr un diagnóstico más temprano. Se han identificado varios factores de riesgo, como fumar, sexo masculino, mayor actividad de la enfermedad, mayor duración de la enfermedad, edad avanzada, FR y ACPA. En los últimos años, se han propuesto varios biomarcadores para la detección de EPI-AR, aunque no existe una prueba universalmente aceptada.

Los anti-CarP reconocen los péptidos homocitrulinados, que se generan por una modificación postraducciona de los residuos de lisina. Estos anticuerpos se asocian a factores de mal pronóstico de la enfermedad, así como a una mayor mortalidad, particularmente debido a enfermedades respiratorias. También, cabe destacar que se han encontrado anti-CarP en pacientes con diversas enfermedades pulmonares crónicas, independientemente del tabaquismo o antecedentes de AR.

El objetivo de este estudio fue analizar la asociación entre anti-CarP y EPI en una población de pacientes con AR.

Se determinaron tres autoanticuerpos anti-CarP IgG contra suero de ternero fetal (Anti-FCS), fibrinógeno (Anti-Fib) y péptido homocitrulinado de fibrina / filagrina (Anti-CFFHP) y un anti-CarP IgA contra FCS (Anti-FCS-IgA) por ELISA de producción propia. Las asociaciones entre anti-CarPs y EPI se analizaron mediante regresión logística multivariable ajustada por tabaquismo, sexo, edad, duración de la AR, FR y ACPA.

Se incluyeron 179 pacientes: 37 (21%) con diagnóstico de EPI-AR diagnosticados por TACAR y confirmados por un comité multidisciplinar. Las especificidades de anti-CarP fueron más frecuentes en el grupo EPI-AR (Anti-FCS 70% vs.43%; Anti-Fib 73% vs.51%; Anti-CFFHP 38% vs.19%; anti-CarP-IgA 51% vs.20%, $p < 0.05$ para todas las comparaciones). Los títulos séricos de anti-CarP fueron significativamente mayores en pacientes con EPI-AR. Las especificidades de anti-CarP mostraron un efecto robusto para aumentar las probabilidades de EPI en el análisis multivariado (Anti-FCS (OR: 3.42; CI95%: 1.13-10.40), Anti-Fib (OR: 2.85; CI95%: 0.83-9.70) , Anti-CFFHP (OR: 3.11; CI95%: 1.06-9.14) y Anti-FCS-IgA (OR: 4.30; CI95%: 1.41-13.04)). Para validar los resultados, se obtuvieron muestras de pacientes de otro hospital. En dicha cohorte, llamada cohorte de replicación se observaron hallazgos similares.

En conclusión, este es el primer estudio que describe asociación entre los anti-CarP y EPI-AR. Esta relación se mantiene incluso después de ajustar por múltiples factores de confusión, incluidos ACPA y RF. Estos hallazgos plantean el debate sobre si existe un vínculo entre la homocitrulinación y el desarrollo de esta grave manifestación extraarticular en la población de AR.

CUARTO TRABAJO

Anti-carbamylated protein antibodies are associated with early abatacept response in rheumatoid arthritis

Raul Castellanos-Moreira, Antonio Gómez, Isabel Haro, Virginia Ruiz-Esquide, Sara Marsal, Raimon Sanmarti

Anti-carbamylated protein antibodies are associated with early abatacept response in rheumatoid arthritis

**Comment on:
Anti-carbamylated protein antibodies as a clinical response predictor in rheumatoid arthritis patients treated with abatacept**

Sirs,

We read the article by Kumar *et al.*, which is the first to address the association between anti-carbamylated protein antibodies (anti-CarP) and the response to abatacept (ABA) in rheumatoid arthritis (RA), with great interest. The most striking findings were the better response (a significant reduction in δ -DAS28-PCR) to ABA in anti-CarP positive patients and a reduction in anti-CarP levels. No differences in the therapeutic response were found when analyzed according to ACPA nor rheumatoid factor status (1).

This prompted us to assess whether we could reproduce their observations. The PACTABA study is a Spanish multicenter, observational sub-study of the ASCORE trial (NCT02090556) (2), including active RA patients who had previously failed with ≥ 1 conventional DMARD or ≥ 1 biologic therapy. Subcutaneous ABA was administered (125 mg weekly) and patients were followed prospectively. The therapeutic response was determined by δ -DAS28 (baseline to 3 months) and EULAR response criteria at 3 months of follow-up. Seventy-nine patients were included, of whom only the 65 who had sufficient information for data extraction were analysed. Anti-CarP were assessed at 0 and 3 months by a homemade ELISA test using fetal calf serum (cut-off ≥ 132.5 AU; 96% specificity vs. healthy population). The study is supported by Bristol Myers Squibb (BMS). Fifty-two patients were female (80%), with mean age of $55.1(\pm 13.9)$ years and a disease duration of $9.5(\pm 7.2)$ years. Eighty percent were ACPA positive and 58.5% had previously failed with ≥ 1 biologic therapy. At baseline, 28(43.1%) patients were anti-CarP positive and no difference in DAS28 was observed according to anti-CarP status. At three months of follow up, a significant reduction in δ -DAS28 was observed in anti-CarP positive patients compared with anti-CarP negative patients (-1.904 vs. -0.212 ; $p < 0.005$) (Fig. 1a). According to anti-CarP status, a similar proportion achieved a EULAR response (13/32(41%) vs. 8/21(38%); $p = \text{NS}$). However, EULAR responders had higher baseline anti-CarP levels than non-responders (451.3 ± 675.4 vs. 152.6 ± 158.3 ; $p = 0.018$) (Fig. 1b). In addition, responders showed a significant reduction in anti-CarP levels after 3 months on treat-

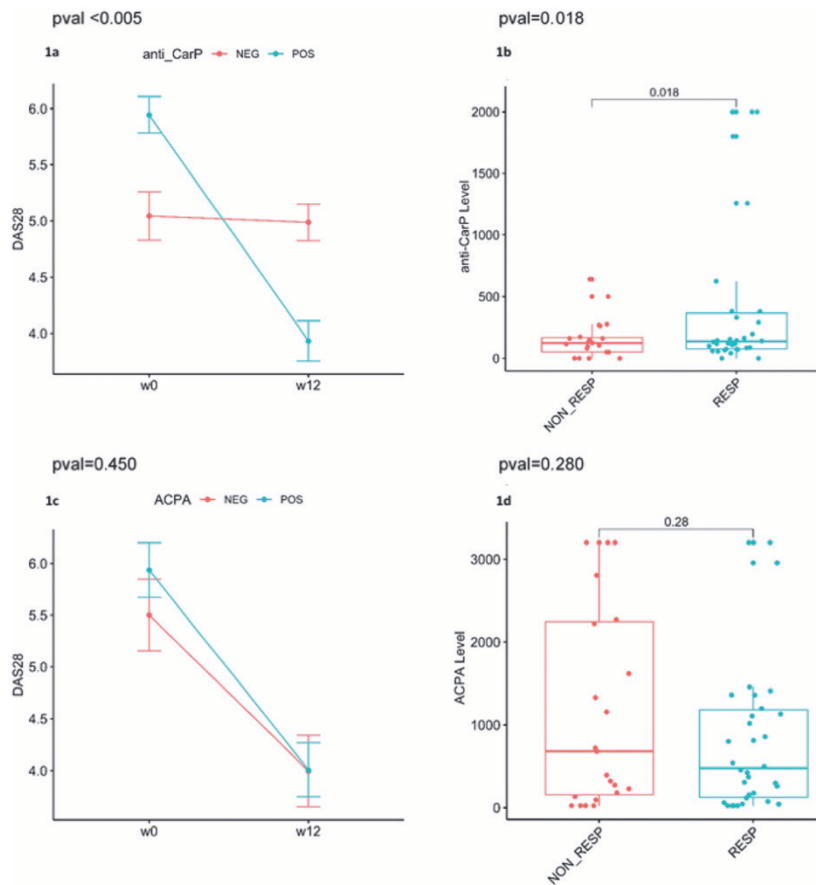


Fig. 1. a: δ -DAS28 according to anti-CarP status; b: anti-CarP levels according to EULAR response criteria; c: δ -DAS28 according to ACPA status; d: ACPA levels according to EULAR response criteria.

ment with ABA, a finding not observed in non-responders (-84.8 AU vs. $+34.92$ AU; $p: 0.023$). No differences were observed in δ -DAS28 according to ACPA status (Fig. 1c) or ACPA baseline levels between responders and non-responders (Fig. 1d). Our findings reaffirm the report by Kumar *et al.* and posit a debate on whether anti-CarP are an ABA response biomarker in RA patients. This could be due to the similar chemical structure in the antigenic targets (homocitrulline and citrulline) of anti-CarP and ACPA or to the wide overlap between the two antibodies in RA patients. Nonetheless, the environmental and genetic backgrounds of the two autoantibodies differ (3). Anti-CarP and ACPA are, independently, poor RA prognosis factors (4, 5) and inhibition studies have shown that the overlap is merely a casual finding (6). ACPA have been shown to be a reliable ABA response biomarker in *post hoc* analyses from randomised controlled trials and large observational studies (7-9). However, neither we nor Kumar *et al.* (1) found differences in the treatment response according to ACPA status. This might be explained by the small sample size of the two studies.

The low sensitivity of anti-CarP (10), together with the overlap of anti-CarP with ACPA, casts doubt on the predictive value of anti-CarP in the treatment response to ABA. However, the findings of Kumar *et al.* and ourselves suggest that anti-CarP are an early response biomarker for ABA, which may be more specific but less sensitive than ACPA. Testing for anti-CarP could be especially useful in ACPA negative patients. These are exploratory analysis and the results should be interpreted with caution. Further studies should include larger populations and analyse long-term outcomes.

R. CASTELLANOS-MOREIRA¹,
A. GOMEZ²,
I. HARO¹,
V. RUIZ-ESQUIDE¹,
S. MARSAL²,
R. SANMARTI¹, MD, PhD

¹Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona;
²Rheumatology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona;
³Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.

Letters to the Editors

Please address correspondence to:

Raimon Sanmarti,
Arthritis Unit - Rheumatology Department,
Hospital Clinic of Barcelona,
Villarroel 170,
08036 Barcelona, Spain.
E-mail: sanmarti@clinic.cat

Funding: this study was supported by
Bristol-Myers Squibb.

Competing interests: none declared.

© Copyright CLINICAL AND
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2021.

References

1. KUMAR R, PIANTONI S, BOLDINI M *et al.*: Anticarbamylated protein antibodies as a clinical response predictor in rheumatoid arthritis patients treated with abatacept. *Clin Exp Rheumatol* 2020 Apr 27 [Online ahead of print].
2. ALTEN R, MARIETTE X, BUCHI M *et al.*: AB0361 ASCORE, a 2-year, observational, prospective multicentre study of subcutaneous abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis in routine clinical practice: 1-year interim analysis. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: (Suppl. 2): 1639.
3. JIANG X, TROUW LA, VAN WESEMAEL *et al.*: Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1761-8.
4. AJEGANOVA S, VAN STEENBERGEN HW, VERHEUL MK *et al.*: The association between anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies and radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a study exploring replication and the added value to ACPA and rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 112-8.
5. HUMPHREYS JH, VERHEUL MK, BARTON A *et al.*: Anticarbamylated protein antibodies are associated with long-term disability and increased disease activity in patients with early inflammatory arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1139-44.
6. JUAREZ M, BANG H, HAMMAR F, REIMER U *et al.*: Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1099-4107
7. ALLEN R, MARIETTE X, LORENZ HM *et al.*: Predictors of abatacept retention over 2 years in patients with rheumatoid arthritis: results from the real-world ACTION study. *Clin Rheumatol* 2019; 38: 1413-24.
8. HARROLD LR, LITMAN HJ, CONNOLLY SE *et al.*: Comparative effectiveness of abatacept versus tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis who are anti-CCP positive in the United States Corrona Registry. *Rheumatol Ther* 2019; 6: 217-30.
9. SOKOLOVE J, SCHIFF M, FLEISCHMANN R *et al.*: Impact of baseline anti-cyclic citrullinated peptide-2 antibody concentration on efficacy outcomes following treatment with subcutaneous abatacept or adalimumab: 2-year results from the AMPLE trial. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 709-14.
10. VERHEUL MK, BOHRINGER S, VAN DELFT MAM *et al.*: Triple positivity for anti-citrullinated protein autoantibodies, rheumatoid factor, and anti-carbamylated protein antibodies conferring high specificity for rheumatoid arthritis: implications for very early identification of at-risk individuals. *Arthritis Rheumatol* 2018; 70: 1721-31.

Resumen del cuarto trabajo

A pesar de la alta eficacia de las terapias inmunodirigidas en la AR, hasta un 40% de los pacientes interrumpen el tratamiento por ineficacia o eventos adversos. Hasta la fecha carecemos de biomarcadores de respuesta terapéutico que nos permitan realizar un enfoque medicina personalizada. En consecuencia, seguimos confiando en un enfoque de prueba y error. No obstante, la presencia de ACPA se relacionado con una mejor respuesta a ciertos agentes terapéuticos como ABA y rituximab.

El objetivo de este estudio fue analizar la asociación entre anti-CarP y la respuesta al tratamiento con ABA en una población de pacientes con AR.

Se determinaron autoanticuerpos anti-CarP IgG contra suero de ternero fetal por ELISA casero en un grupo de pacientes incluidos en el estudio PACTABA, un subestadio observacional multicéntrico español del ensayo ASCORE. Se incluyeron pacientes con AR activa que habían fallado previamente con ≥ 1 FARME convencional o ≥ 1 terapia biológica. Dichos anticuerpos fueron medidos de forma basal y a los 3 meses del inicio del tratamiento.

En total, 79 pacientes fueron incluidos, de los cuales solo se analizaron los 65 que tenían información suficiente para la extracción de datos. En su mayoría eran mujeres (80%), con una edad media de 55,1 ($\pm 13,9$) años y una duración de la enfermedad de 9,5 ($\pm 7,2$) años. El 80% eran ACPA positivos, 43% pacientes eran anti-CarP positivos y el 59% había fallado previamente con ≥ 1 terapia biológica.

A los tres meses de seguimiento, se observó una reducción significativa en el δ -DAS28 en los pacientes anti-CarP positivos en comparación con los anti-CarP negativos (-1,904 vs -0,212; $p < 0,005$). La proporción de paciente que alcanzaron respuesta EULAR fue similar según el estado anti-CarP (positivo (41%) vs negativos (38%)). No obstante, los respondedores EULAR tenían niveles de anti-CarP basales más altos que los no respondedores ($451,3 \pm 675,4$ vs $152,6 \pm 158,3$;

p: 0,018). Además, los respondedores mostraron una reducción significativa en los niveles de anti-CarP después de 3 meses de tratamiento con ABA, un hallazgo que no se observó en los no respondedores (-84,8 AU vs +34,92 AU; p: 0,023).

En esta población no se observaron diferencias en δ -DAS28 según el estado de ACPA, tampoco en los niveles basales de ACPA entre respondedores y no respondedores.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que los anti-CarP son un biomarcador de respuesta temprana para ABA, que puede ser más específico, pero menos sensible que ACPA. Estos son análisis exploratorios y los resultados deben interpretarse con precaución.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral se han realizado cuatro estudios con el objeto de analizar el papel de un nuevo miembro de la familia AMPA, como son los anti-CarP en dos poblaciones distintas pero muy relacionadas. Los dos primeros trabajos se centran en el RP, una forma de artritis intermitente, que puede considerarse como parte del espectro clínico de la AR o como una forma preclínica de esta enfermedad. En el tercer trabajo se analiza la asociación entre los anti-CarP y una de las manifestaciones extraarticulares más graves de la AR como es la enfermedad pulmonar intersticial. En el último trabajo se estudia la asociación entre dichos anticuerpos y la respuesta terapéutica a ABA, un fármaco biológico ampliamente utilizado para el tratamiento de la AR.

Todos estos estudios se han realizado utilizando sustratos antigénicos de proteínas/péptidos carbamilados (homocitrulinados) de síntesis propia (Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos del IQAC-CSIC) para la determinación de anti-CarP en el suero de pacientes y controles.

En el primer trabajo de la presente tesis doctoral (**Castellanos-Moreira et al. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2020**) analizamos por primera vez la prevalencia de anti-CarP en el RP puro y comparamos el patrón de sus isotipos con el de la AR establecida.

El RP es una entidad que precede en muchos casos a la AR (230). Dicha enfermedad presenta fenómenos de autoinmunidad sistémica como es el caso del factor reumatoide y los ACPA, autoanticuerpos característicos de la AR (79, 86, 89). La presencia de estos autoanticuerpos es un factor predictor de evolución hacia AR, aunque un número significativo de casos, incluso con niveles elevados de estos autoanticuerpos no progresan a AR (78). Los motivos por los que algunos de estos pacientes no acaban desarrollando AR aún son desconocidas. Los anti-

CarP se han descrito en alrededor la mitad de pacientes con AR y con una alta especificidad (192). No existen estudios hasta la fecha que analicen la presencia de estos autoanticuerpos en el RP.

En el presente estudio se detectaron anti-CarP en la población con RP, aunque en una proporción significativamente inferior que en la AR (24% vs 64%). Tal como sucede en la AR (216, 231), los anti-CarP se asociaron claramente con la positividad de ACPA, incluso con una mayor superposición entre anticuerpos en el RP (92% vs 68%).

Se estudiaron también los diferentes isotipos IgA, IgM e IgG de anti-CarP para comparar la respuesta inmune a los antígenos homocitrulinados en el RP y en la AR. En cuanto al patrón de isotipos, observamos que las proporciones y niveles de todos los isotipos fueron más altas en los pacientes con AR. La IgG fue la inmunoglobulina predominante tanto en el RP como en la AR. Similar a una cohorte holandesa (231) en la población con AR establecida evidenciamos un espectro de isotipos bien repartido entre las IgG, IgM e IgA. No obstante, la respuesta de la IgA e IgM fue mucho menor en la población con RP.

De forma llamativa, las mayores diferencias tanto en las proporciones como de títulos se observaron en el isotipo IgM. Si consideramos la corta vida media de esta inmunoglobulina, la baja prevalencia de IgM anti-CarP observada en el PR puede interpretarse como un signo de activación discontinua de las células B (232).

Cabe mencionar, que previamente se había analizado la respuesta a antígenos citrulinados en la misma población de estudio; en aquel trabajo el patrón de isotipos de los ACPA se comportó de manera similar (90). La limitada respuesta inmune frente a los péptidos carbamilados y citrulinados podría explicar por qué no todos los pacientes con RP con anticuerpos positivos evolucionan a una artritis persistente.

Este distinto perfil de AMPAs en pacientes con RP, con un patrón más restringido, también se ha descrito en las fases preclínicas de la AR (215) y en familiares asintomáticos de pacientes con AR (233) y podría explicar un papel menos patogénico de los autoanticuerpos en dichas poblaciones (234).

Los ACPA y anti-CarP circulantes en suero pueden preceder varios años el debut de los síntomas de la AR (215, 235). El número de especificidades y títulos de ambos anticuerpos aumentan a medida se acerca el debut de la AR (215, 236). Aunque todos los isotipos de ACPA pueden estar presentes en la etapa pre-AR (235), la IgG predomina en esta fase y aparece antes que la IgM y la IgA (237). Una vez establecida la AR el espectro de anticuerpos se reparte uniformemente entre los tres isotipos (231). Es probable que el patrón de isotipos del RP se comporte de forma similar al de la fase pre-AR.

En este estudio también se analizó si los anti-CarP determinan un fenotipo clínico característico en el RP. A diferencia de los ACPA, donde su presencia condiciona a una edad más temprana de debut del RP, brotes más frecuentes y una duración más corta de las crisis (89, 97), no encontramos diferencias clínicas entre los RP según el estatus de anti-CarP.

Este es el primer estudio que evidencia la presencia de un AMPA distinto a los ACPA en el RP. No obstante, al tratarse de una cohorte transversal no podemos esclarecer si este patrón de AMPA más restringido se asocia con un menor riesgo de progresión hacia AR. Probablemente varios factores están implicados en el desarrollo posterior de AR en estos pacientes, desde determinantes genéticos o la naturaleza de la respuesta inmune a través de los anticuerpos AMPA. Otros factores como la glicosilación de la fracción Fc de los anticuerpos podrían también tener un papel relevante (232).

En el segundo artículo de la presente tesis doctoral (*Castellanos-Moreira et al. J Rheumatol. 2020*), analizamos la prevalencia de RP preexistente en una cohorte

de pacientes con AR establecida y examinamos si estos pacientes tienen un fenotipo clínico y perfil de anticuerpos (incluidos los anti-CarP) distintivo.

Es posible que el RP forme parte del mismo espectro que la AR (86, 238), dada la alta prevalencia de autoanticuerpos (90), la similar distribución de las articulaciones afectadas (87, 88) y la alta tasa de progresión hacia la AR. Pero a pesar de estas similitudes con la AR, la naturaleza recurrente-remitente de las crisis palindrómicas se asemeja al cuadro clínico de un trastorno autoinflamatorio (80).

Sabemos que las personas que sufren de RP presentan un gran riesgo de padecer AR en comparación a la población general (104). La alta tasa de progresión (que puede llegar a ser 2 de cada 3 pacientes) hacia una AR ha sido confirmado por varias cohortes de RP provenientes de diferentes puntos geográficos(77-79, 102, 106). Sin embargo, no existen prácticamente estudios en la literatura que analicen la prevalencia exacta de pacientes con una AR establecida que inicien su enfermedad en forma de RP. Por otra parte, tampoco se ha estudiado previamente si estos pacientes que iniciaron la AR en forma de RP tienen un fenotipo clínico o un perfil de autoanticuerpos característico y diferente, respecto al que tienen los pacientes que no debutaron como RP.

La prevalencia de RP previo al debut de la AR en nuestra cohorte de AR establecida fue del 18%. Estos resultados son muy similares a lo observado en el estudio AUDIT que encontró una prevalencia del 16% (83), pero más bajo que en la cohorte canadiense de AR temprana (CATCH), donde reportaban una prevalencia del 40% (82). La discrepancia podría ser por diferencias en la definición de artritis intermitente, ya que el estudio canadiense solo incluía un auto-cuestionario, mientras que los criterios de nuestra cohorte eran más estrictos y requerían de confirmación por parte del clínico.

El período de latencia de 1,2 años entre el inicio de la RP y el debut de la AR de nuestra cohorte confirma que la mayoría de los pacientes, y especialmente

aquellos con autoanticuerpos, desarrollan AR en los primeros años tras el inicio de los síntomas (77).

Al valorar el fenotipo clínico, no se observaron diferencias significativas en la actividad de la enfermedad, las tasas de remisión, el grado de discapacidad o las tasas de enfermedad erosiva entre pacientes con y sin RP previo al inicio de AR. No obstante, la tasa de tabaquismo y de uso de hidroxicloroquina fueron significativamente más altas en los pacientes con RP preexistente.

El uso de tabaco varía entre un 21-32% entre los pacientes con RP (97, 98). Los estudios que han valorado este tema solo analizan el tabaquismo al momento de inclusión. Llama la atención la gran proporción de fumadores (previo o actual) en nuestra población de AR con RP preexistente (51%), este hallazgo ha sido corroborado posteriormente en la cohorte canadiense CATCH (82). La importancia de este hecho radica en que el tabaquismo es el factor de riesgo ambiental más importante para la generación de autoanticuerpos (193, 239) así como para el desarrollo de la AR (14, 17, 18).

El curso clínico del RP es muy particular, con brotes autolimitados de muy corta duración (usualmente <72 horas) de dolor, tumefacción y en ocasiones eritema por inflamación articular y periarticular, que no causa daño residual (76, 102).

De forma interesante, identificamos la persistencia de crisis típicas de RP tras el inicio de la AR en la mayoría de casos de pacientes que iniciaron como RP. Este hallazgo no había sido descrito previamente. Recientemente, Savic, *et al.* reportaron una serie de AR seropositiva con brotes severos de inicio súbito y autolimitados en los que se confirmó la presencia mutaciones o polimorfismos de genes autoinflamatorios (240), sugiriendo que, en algunos casos podría coexistir la AR y una enfermedad autoinflamatoria. También, el hecho que un subgrupo de pacientes con RP (en su mayoría ACPA negativos) tienen mutaciones MEFV, sugiere la participación del sistema inmune innato (96).

Los antimaláricos se utilizan habitualmente en el RP, ya que parecen retrasar, pero no evitar el desarrollo de artritis persistente (106). Asimismo, estos fármacos reducen la frecuencia e intensidad de las crisis (111). Por lo que el mayor uso de hidroxicloroquina en aquellos enfermos con antecedentes de RP no es de extrañar si consideramos la persistencia de las crisis en gran parte de ellos. Es difícil establecer si el uso de hidroxicloroquina previene las crisis palindrómicas una vez establecida la AR. Los brotes persistieron independientemente al uso de antimaláricos, aun así, no podemos descartar que se trate de un sesgo de confusión por indicación. El diseño de nuestro estudio no permite realizar conclusiones definitivas sobre este asunto.

Como se ha comentado anteriormente, el perfil de anticuerpos en el RP es muy parecido al de la AR. En esta cohorte de AR establecida, la prevalencia y niveles de anticuerpos (anti-CarP/ACPA/FR) fue similar entre los dos grupos evaluados, con tendencia a una mayor seropositividad en aquellos con antecedentes de RP. Este hallazgo contrasta con el patrón restringido de anti-CarP y ACPA objetivado en el RP puro en el primer trabajo de esta tesis y en un estudio previo (90). Tomando en cuenta lo anterior, podemos especular que la respuesta restringida de las células B en el RP puro, va madurando a medida que avanza la enfermedad en aquellos pacientes que desarrollan AR.

El desarrollo de la AR en los pacientes con RP es un proceso de varios pasos, que va desde la etapa fase de crisis agudas autolimitadas, sin daño residual, hasta el paso a la artritis persistente. Tanto el sistema inmune innato como adaptativo parecen participar en la etiopatogenia del RP. Es posible que la inmunidad innata predomine en las fases iniciales y que el sistema adaptativo vaya adquiriendo mayor relevancia a medida que avanza la enfermedad, sobre todo en aquellos pacientes que progresan a AR. Sin embargo, los mecanismos envueltos en cada fase aún están lejos de entenderse completamente y los desencadenantes que conducen a la transición de una fase a otra aún no se han identificado.

En el tercer trabajo de la presente tesis doctoral (*Castellanos-Moreira et al. Ann Rheum Dis. 2020*), analizamos la asociación entre anti-CarP y la presencia de EPI en los pacientes con AR.

La AR es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la inflamación sinovial y se expresa clínicamente como una artritis inflamatoria. No obstante, se trata de una enfermedad sistémica que puede afectar a varios órganos. Fuera de aparato locomotor, el sistema respiratorio es donde la AR se manifiesta más comúnmente (113). Entre las formas de afectación pulmonar en esta población la EPI-AR resalta por su alta morbimortalidad (114, 115) y su relativa alta prevalencia (118), razones por las cuales ha suscitado un gran interés en la comunidad reumatológica.

A pesar de la disminución en la mortalidad en la AR en últimos años (18-19) y del amplio arsenal terapéutico disponible, las muertes por enfermedad pulmonar se mantienen estables (19). En caso de seguir esta tendencia, las enfermedades respiratorias podrían convertirse en la principal causa de muerte en esta población en un futuro por delante de la ECV y las neoplasias, principales causas de muerte en la actualidad. La contribución de la EPI-AR queda reflejada por su alta tasa de mortalidad (10 veces mayor en aquellos con EPI) (115) y una supervivencia media de sólo 3 años desde diagnóstico de la EPI (114, 121, 165).

Por lo tanto, la EPI-AR constituye una necesidad no cubierta y la búsqueda de biomarcadores de cribado para un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno es trascendental.

Se han detectado anti-CarP en pacientes con diversas enfermedades pulmonares no relacionadas con EPI, independientemente de su historial de tabaquismo o AR (200, 241). Una cohorte prospectiva de AR encontró una mayor mortalidad en aquellos pacientes con AR anti-CarP positivo y dichos anticuerpos se asociaron sobre todo con muertes atribuidas a enfermedades respiratorias (210). Por lo tanto, decidimos explorar mediante 3 especificidades de antígenos

homocitrulinados (3 de isotipo IgG y una IgA) la asociación entre los anti-CarP y la EPI-AR en una cohorte de AR establecida que incluía pacientes con y sin EPI de nuestro hospital y en una serie de replicación de otro centro hospitalario para validar los resultados.

En nuestra cohorte y en la serie de replicación se observó una mayor prevalencia de todos los anti-CarP en el grupo con AR-EPI. Las diferencias fueron significativas para todas las comparaciones. Adicionalmente, las concentraciones de anticuerpos de las diferentes especificidades fueron más altas en los pacientes con afectación pulmonar, llegando a ser hasta 4 veces mayores.

El análisis multivariante mostró una asociación robusta entre los anti-CarP y la EPI, con un efecto constante hacia el aumento de las probabilidades de EPI en ambas cohortes con todas las especificidades. El efecto persistía en los modelos de regresión logística incluso después de ajustar por factores de confusión pertinentes como son los ACPA, FR, edad, tabaquismo, tiempo de evolución de la enfermedad y el sexo. Basamos el modelo en estas características utilizadas habitualmente en la práctica clínica, ya que han demostrado tener una potente capacidad de detectar EPI-AR sintomáticos y subclínicos (128). Lamentablemente, otras variables como el tratamiento o actividad de la enfermedad no fueron incluidas en los modelos. En parte por el diseño del estudio, el tamaño de la muestra y por las inconsistencias sobre el peso de dichas variables en la literatura (52, 125, 242-244). Por estos motivos, junto al riesgo de sobreajuste, decidimos optar por una aproximación más conservadora al construir nuestros modelos.

Esta es la primera ocasión en la que se describe una relación entre los anti-CarP y la enfermedad intersticial pulmonar en la AR. De forma casi simultánea, un grupo de investigación independiente publicó resultados similares (245), concediendo validez externa a nuestro trabajo y realzando el potencial de los anti-CarP como posibles biomarcadores de EPI-AR.

Otros anticuerpos frecuentemente presentes en suero de pacientes con AR como los anti-APA (246), el FR y los ACPA (113) también se han relacionado con la EPI. Entre ellos los ACPA son los que presentan el mayor grado de evidencia (159). Sin embargo, hasta el 17% de los pacientes con EPI-AR pueden ser negativos para los ACPA (166). Así como en otras cohortes (247, 248), en este trabajo no encontramos una asociación entre la EPI y los ACPA.

La asociación entre anti-CarP y la EPI-AR abre un debate sobre el papel potencial de la homocitrulinación y la consecuente respuesta de anticuerpos, en el desarrollo de la EPI. Hasta ahora, ningún estudio ha evaluado la presencia de homocitrulina en el tejido pulmonar de pacientes con AR o la prevalencia de anti-CarP en la FPI a diferencia de la citrulina (132) o los ACPA (149), respectivamente. Por otra parte, si se han detectado péptidos carbamilados en la sinovial de pacientes con AR (197) y en tejido pulmonar de fumadores y pacientes con asma (249, 250). Además se han encontrado anti-CarP en sujetos con bronquiectasias, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica sin antecedentes de tabaquismo o AR (200, 241).

Es razonable especular que encontremos una amplia gama de péptidos homocitrulinados en el pulmón de pacientes con AR. El reconocimiento de estos por los anti-CarP circulantes sería capaz de promover una respuesta inflamatoria, esencial en la génesis y progresión de la fibrosis pulmonar (251, 252). Una explicación alternativa podría ser daño pulmonar directo por la cascada inflamatoria precipitada por una mayor sensibilidad hacia las proteinasas o la presencia de radicales libres y otros mediadores inflamatorios producidos por los péptidos carbamilados presentes en el pulmón (176).

Sabemos que la IgA juega un papel trascendental en la respuesta humoral en las superficies de mucosas del tracto respiratorio (253). Curiosamente, entre todas los anti-CarP examinadas en nuestro estudio, la IgA-anti-CarP presentó la mayor

fuerza de asociación con la EPI-AR, alimentando la hipótesis de que los anticuerpos relacionados con la AR se originan en la mucosa respiratoria (254).

La asociación entre diferentes anti-CarP y la EPI-AR incluso después de ajustar por múltiples factores de confusión, postula un vínculo entre la homocitrulinación y el desarrollo de esta grave manifestación extraarticular. Sospechamos que ésta sería una de múltiples vías implicadas con la lesión pulmonar en la población con AR y creemos que dilucidar estos mecanismos nos permitirá conducir estrategias más efectivas de prevención y tratamiento en el futuro.

En el cuarto y último trabajo de esta tesis (*Castellanos-Moreira et al. Clin Exp Rheumatol. 2021*) analizamos el papel de los anti-CarP como biomarcador de respuesta terapéutica a ABA en la AR.

Históricamente la AR había sido considerada como una enfermedad altamente discapacitante con una gran morbimortalidad, para la cual no existían tratamientos efectivos. No obstante, este concepto ha cambiado tras el desarrollo de terapias dirigidas a inhibir dianas específicas involucradas en la modulación de ciertas citocinas. El abanico farmacológico de la AR incluye el uso de terapias sintéticas convencionales y biológicas como los antagonistas del TNF, anti-activador de células T, anti-linfocitos B CD20+ e inhibidores de IL-6. De forma más reciente se han aprobado las pequeñas moléculas, entre ellos los inhibidores de JAK. Además, se espera la aprobación de nuevos tratamientos para la AR en los próximos años (55, 58).

En general, todas las terapias avanzadas inmunodirigidas son capaces de reducir considerablemente la actividad de la enfermedad con una eficacia similar en prácticamente todos los objetivos estudiados, independientemente de la diana terapéutica (58-61). Pero hasta un 40% de los pacientes interrumpen el tratamiento por ineficacia o eventos adversos (62, 63). Además, la probabilidad de respuesta a un tratamiento disminuye gradualmente según el número creciente de fracasos a tratamientos previos. (64, 65). Por lo que un subgrupo de

pacientes puede permanecer sintomático a pesar de múltiples cambios de tratamiento, convirtiéndose en AR "refractarias" (255).

Por lo tanto, uno de los principales desafíos en el manejo de la AR es poder predecir la respuesta al fármaco antes de iniciar el tratamiento (256). Las guías EULAR, posicionan a todas las terapias avanzadas inmunodirigidas por igual tras el fracaso a los FAMEs sintéticos convencionales (55).

Una herramienta capaz de proporcionar la probabilidad de respuesta o falta de respuesta a tratamientos específicos podría suponer un importante beneficio. Se han probado varios enfoques para identificar biomarcadores, incluida la genómica, la transcriptómica, la epigenética y la proteómica (257), pero ninguna de estas estrategias ha aportado una información relevante y consistente que pueda ser útil en la práctica clínica.

Los ACPA se consideran hoy en día como los únicos biomarcadores que podrían ser útiles ya que se han asociado a una mejor respuesta al menos a dos agentes biológicos: rituximab y ABA (72, 74). Para este último, la evidencia del análisis post hoc del estudio AMPLE (73) y de grandes estudios observacionales (74, 258, 259) respaldan el uso de ABA en los pacientes ACPA positivos.

ABA es una proteína de fusión que modula selectivamente la señal coestimuladora CD80/86:CD28 de las células presentadoras de antígenos que como consecuencia inhibe la proliferación de células T y la respuesta inmunitaria de las células B (260).

Dado la gran similitud en la estructura química entre las dianas antigénicas de los ACPA y los anti-CarP (192), decidimos explorar si también existía asociación entre los anti-CarP y la respuesta al ABA en una serie multicéntrica (PACTABA) de pacientes con AR establecida que iniciaron dicho tratamiento.

En la cohorte examinada, se observó una seroprevalencia de anti-CarP del 43%, una sensibilidad acorde a lo descrito en la literatura (201). Después de 3 meses

de iniciar tratamiento con ABA, hubo una reducción significativa en δ -DAS28 en los pacientes anti-CarP positivos en comparación con los negativos. Llamativamente, aquellos sujetos catalogados como respondedores (según los criterios EULAR) presentaban niveles de anti-CarP basales más altos. De forma paralela a nuestro estudio, una cohorte italiana demostró una correlación lineal positiva entre los valores de anti-CarP y la respuesta al ABA (261). A modo que a mayores valores de anti-CarP basal mayor el δ -DAS28 a los 6 meses del inicio del tratamiento.

Adicionalmente, observamos una disminución significativa en los niveles de anti-CarP entre los respondedores a los 3 meses. En el trabajo italiano, la disminución fue gradual en el tiempo y continuaba aún a los 12 meses tras iniciar el tratamiento con ABA (261). La modulación de los anti-CarP mediada por ABA ya había sido descrita en un análisis post hoc del estudio AVERT (262).

Se han detectado anti-CarP en modelos animales de artritis inducida por colágeno incluso desde fases presintomáticas. El tratamiento con ABA es capaz de inhibir la generación de anti-CarP y reduce de forma considerable el riesgo de progresión de la enfermedad. La inhibición de la IL-6 con tocilizumab no ha mostrado ser capaz de reproducir resultados similares (263). Nuestro estudio fue el primero en analizar la modulación de los anti-CarP por ABA en humanos y en examinar si esta modulación se relaciona con una mejor respuesta al ABA.

Aunque nuestros resultados podrían estar sesgados a una respuesta relativamente "tempana", se ha demostrado que el nivel de actividad de la enfermedad a los 3 meses de iniciar un tratamiento tiene una fuerte correlación con el nivel de actividad y la progresión radiológica al año (264, 265).

Curiosamente, tanto nosotros como la cohorte italiana fuimos incapaces de detectar diferencias en la respuesta al tratamiento según el estado de los ACPA. Estudios más grandes solo han encontrado mejoría con ABA en ciertos subgrupos de pacientes ACPA positivos, como los que tienen títulos "muy elevados" en el

estudio AMPLE (73), o aquellos que habían fallado previamente a anti-TNF en el Registro Corrona (259). Es posible que la ausencia de asociación entre los ACPA y la respuesta a ABA en nuestro trabajo se deba a un error tipo II inducido por el tamaño muestral y/o las características de la población en estudio.

Recientemente se ha descrito que los anticuerpos contra la vimentina carbamilada son un biomarcador de buena respuesta al tratamiento con baricitinib (un inhibidor de JAK) en un análisis post hoc del estudio de fase III RA-BEGIN. A diferencia de los anti-CarP, los ACPA no mostraron ser un factor pronóstico terapéutico en el mismo estudio (266).

Aunque estos análisis son exploratorios, nuestros hallazgos sugieren el potencial de los anti-CarP como biomarcador de respuesta temprana para el ABA, dichos anticuerpos podrían ser más específicos, aunque menos sensibles que los ACPA. Testarlos podría ser especialmente útil en pacientes negativos a ACPA. Nuestros hallazgos requieren validación externa en poblaciones más extensas e incluir resultados a mediano-largo plazo.

Creemos que el uso rutinario de los anti-CarP podría aportar beneficios fármaco-económicos y clínicos. Esperamos que, en un futuro, podremos determinar a priori el tratamiento más adecuado según el contexto clínico y perfil serológico del paciente con un enfoque personalizado para cada paciente individual, en lugar de un enfoque estandarizado para todos.

Un tema relevante para los cuatro trabajos es la superposición entre anticuerpos (anti-CarP y ACPA) que varió entre el 57% en la población con AR incluida en el segundo trabajo hasta un 92% en la población con RP puro. Estos resultados podrían generar dudas sobre el papel pronóstico de los anti-CarP y la validez de nuestros resultados.

A pesar de las grandes similitudes entre los anti-CarP y los ACPA, existen claras diferencias en los factores genéticos y ambientales implicados en los procesos de

carbamilación o citrulinación (241, 267). Adicionalmente, pese a que ambos anticuerpos suelen coexistir en un mismo paciente son factores independientes de enfermedad más grave (192, 203, 204).

Es de amplio conocimiento que los anti-CarP se asocian con los ACPA (216). Pero el hecho que en un subgrupo de pacientes ACPA negativos detectaremos anti-CarP y que estudios de inhibición han confirmado una reactividad cruzada limitada entre ambos (192, 202), sugiere que el solapamiento es simplemente un hallazgo casual pero esperable.

En los últimos años, varios de los grupos de investigación más relevantes del campo han centrado sus esfuerzos al estudio de la dinámica entre los anticuerpos y sus epítomos. Para tal fin se han desarrollado antígenos altamente purificados y anticuerpos monoclonales muy específicos para dichos antígenos, tanto en modelos animales como humanos. Como fruto de dichos estudios, se ha demostrado que la inmunización con un antígeno bien definido es capaz de generar de anticuerpos, pero no solo contra el antígeno específico inmunizado sino también contra otras PTM (228). Asimismo, un ACPA monoclonal altamente específico reconoce con una alta afinidad a la citrulina pero también muestra polireactividad cruzada con la homocitrulina y lisina acetilada (229, 268-271).

De acuerdo con el dogma convencional, las familias clonales de anticuerpos derivan de una única célula B parental activada. Este no parece ser el caso de los AMPA, al menos no en términos de su especificidad antigénica (272). Un paciente con AR parece tener varios clones de AMPA con distintos perfiles de polireactividad capaces de reconocer múltiples secuencias de aminoácidos, en lugar de proteínas específicas, propiedad clave de la AR (269).

Los mecanismos implicados en la interacción entre antígenos y la respuesta de las células B aún no se comprenden completamente. Descifrarlos podría darnos pistas sobre las vías implicadas en la AR, permitiendo el desarrollo nuevas

pruebas diagnósticas, terapias de próxima generación y elucidar vías para la prevención de la enfermedad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los anti-CarP se observan en uno de cada cuatro pacientes con RP puro, una prevalencia mucho menor que en la AR establecida, con un patrón de isotipos más restringido sobre todo con menor respuesta de IgA e IgM. Sin embargo, el perfil de anticuerpos es prácticamente idéntico en los pacientes con AR con o sin PR preexistente. Esto podría sugerir una maduración progresiva en la respuesta de los linfocitos B hacia los péptidos que sufren una PTM a medida que el RP progresa a AR.
2. Se ha encontrado por primera vez una fuerte asociación entre los anti-CarP y la enfermedad pulmonar intersticial en la AR, incluso después de ajustar por factores de confusión pertinentes. El efecto fue consistente entre las diferentes especificidades de anti-CarP, especialmente con el isotipo IgA. Estos hallazgos postulan un vínculo entre la homocitrulinación y el desarrollo de esta grave manifestación extraarticular.
3. Los anti-CarP se asocian a una mejor respuesta clínica temprana a abatacept en pacientes con AR establecida. Los anti-CarP podrían ser considerados potenciales biomarcadores de respuesta a este fármaco biológico

Uno de los grandes desafíos de la vida es conocer lo suficiente para pensar que tienes razón, pero no lo suficiente como para saber que estás equivocado.

Neil deGrasse Tyson

REFERENCIAS

1. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2010;35(1):10-4.
2. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2006;36(3):182-8.
3. 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;41(1):88-95.
4. 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;43(1):30-7.
5. Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutierrez-Achury J, Do R, Voight BF, et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2012;44(5):483-9.
6. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30(11):1205-13.
7. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 2014;506(7488):376-81.
8. Raychaudhuri S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(2):109-18.
9. Karlson EW, Chibnik LB, Kraft P, Cui J, Keenan BT, Ding B, et al. Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1077-85.
10. Wu X, Yang HJ, Jung Kim M, Zhang T, Qiu JY, Park S. Association between PTPN22-1123G/C and susceptibility to rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2019;22(5):769-80.
11. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(3):347-69.
12. Crowson CS, Matteson EL, Myasoedova E, Michet CJ, Ernste FC, Warrington KJ, et al. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):633-9.
13. Alpizar-Rodriguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(8):1254-63.
14. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R61.
15. 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;69(1):70-81.

16. Svendsen AJ, Gervin K, Lyle R, Christiansen L, Kyvik K, Junker P, et al. Differentially Methylated DNA Regions in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Rheumatoid Arthritis: An Epigenome-Wide Study. *Front Immunol.* 2016;7:510.
17. Sokolove J, Wagner CA, Lahey LJ, Sayles H, Duryee MJ, Reimold AM, et al. Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(11):1969-77.
18. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):508-11.
19. 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;64(4):582-6.
20. Too CL, Muhamad NA, Ilar A, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, et al. Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(6):997-1002.
21. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
22. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke AM, et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(3):604-13.
23. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016;8(369):369ra176.
24. Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta EV, Murray J, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2016;8(1):43.
25. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* 2013;2:e01202.
26. Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *J Clin Invest.* 2017;127(8):2946-56.
27. Ljung L, Rantapaa-Dahlqvist S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis - a nested case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):277.
28. Johansson K, Askling J, Alfredsson L, Di Giuseppe D, group Es. Mediterranean diet and risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):175.
29. Lu B, Solomon DH, Costenbader KH, Karlson EW. Alcohol consumption and risk of incident rheumatoid arthritis in women: a prospective study. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(8):1998-2005.
30. 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;67(10):1488-92.
31. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(5):1090-100.

32. Trouw LA, Huizinga TW, Toes RE. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. *Ann Rheum Dis*. 2013;72 Suppl 2:ii132-6.
33. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):380-6.
34. de Hair MJ, van de Sande MG, Ramwadhoebe TH, Hansson M, Landewe R, van der Leij C, et al. Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(3):513-22.
35. Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, Bresnihan B, Post WJ, t Hart BA, et al. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41(8):1481-8.
36. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:229.
37. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-19.
38. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*. 2009;15(12):1414-20.
39. Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, Malmstrom V, Klareskog L. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(11):645-53.
40. Keyszer G, Redlich A, Haupl T, Zacher J, Sparmann M, Engethum U, et al. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum*. 1998;41(8):1378-87.
41. Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):656-64.
42. Martins P, Fonseca JE. How to investigate: Pre-clinical rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2019;33(4):101438.
43. Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LG, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):638-41.
44. van Steenbergen HW, Aletaha D, Beart-van de Voorde LJ, Brouwer E, Codreanu C, Combe B, et al. EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(3):491-6.
45. van Steenbergen HW, van der Helm-van Mil AH. Clinical expertise and its accuracy in differentiating arthralgia patients at risk for rheumatoid arthritis from other patients presenting with joint symptoms. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(6):1140-1.
46. Burgers LE, Siljehult F, Ten Brinck RM, van Steenbergen HW, Landewe RBM, Rantapaa-Dahlqvist S, et al. Validation of the EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(12):2123-8.
47. Stack RJ, van Tuyl LH, Sloots M, van de Stadt LA, Hoogland W, Maat B, et al. Symptom complexes in patients with seropositive arthralgia and in patients newly diagnosed with rheumatoid arthritis: a qualitative exploration of symptom development. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(9):1646-53.

48. Chatzidionysiou K, Fragoulis GE. Established rheumatoid arthritis - Redefining the concept. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2020;101476.
49. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
50. Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I, Leeming M, Wylie GL, et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):38-43.
51. Minichiello E, Semerano L, Boissier MC. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Joint Bone Spine*. 2016;83(6):625-30.
52. Theander L, Nyhall-Wahlin BM, Nilsson JA, Willim M, Jacobsson LTH, Petersson IF, et al. Severe Extraarticular Manifestations in a Community-based Cohort of Patients with Rheumatoid Arthritis: Risk Factors and Incidence in Relation to Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *J Rheumatol*. 2017;44(7):981-7.
53. 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;62(9):2569-81.
54. Aggarwal R, Ringold S, Khanna D, Neogi T, Johnson SR, Miller A, et al. Distinctions between diagnostic and classification criteria? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67(7):891-7.
55. Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):685-99.
56. Grigor C, Capell H, Stirling A, McMahon AD, Lock P, Vallance R, et al. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9430):263-9.
57. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):3-15.
58. Kerschbaumer A, Sepriano A, Smolen JS, van der Heijde D, Dougados M, van Vollenhoven R, et al. Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):744-59.
59. Nam JL, Takase-Minegishi K, Ramiro S, Chatzidionysiou K, Smolen JS, van der Heijde D, et al. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):1113-36.
60. Porter D, van Melckebeke J, Dale J, Messow CM, McConnachie A, Walker A, et al. Tumour necrosis factor inhibition versus rituximab for patients with rheumatoid arthritis who require biological treatment (ORBIT): an open-label, randomised controlled, non-inferiority, trial. *Lancet*. 2016;388(10041):239-47.
61. Weinblatt ME, Schiff M, Valente R, van der Heijde D, Citera G, Zhao C, et al. Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: findings of a phase IIIb, multinational, prospective, randomized study. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):28-38.
62. Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U, Dreyer L, Hansen A, Hansen IT, et al. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with

- rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):22-32.
63. Favalli EG, Raimondo MG, Becciolini A, Crotti C, Biggioggero M, Caporali R. The management of first-line biologic therapy failures in rheumatoid arthritis: Current practice and future perspectives. *Autoimmun Rev.* 2017;16(12):1185-95.
64. Hernandez MV, Sanchez-Piedra C, Garcia-Magallon B, Cuende E, Manero J, Campos-Fernandez C, et al. Factors associated with long-term retention of treatment with golimumab in a real-world setting: an analysis of the Spanish BIOBADASER registry. *Rheumatol Int.* 2019;39(3):509-15.
65. Rendas-Baum R, Wallenstein GV, Koncz T, Kosinski M, Yang M, Bradley J, et al. Evaluating the efficacy of sequential biologic therapies for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumor necrosis factor-alpha inhibitors. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(1):R25.
66. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Jr., Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2016;68(1):1-25.
67. Gabay C, Riek M, Scherer A, Finckh A, physicians Sc. Effectiveness of biologic DMARDs in monotherapy versus in combination with synthetic DMARDs in rheumatoid arthritis: data from the Swiss Clinical Quality Management Registry. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(9):1664-72.
68. Jorgensen TS, Kristensen LE, Christensen R, Bliddal H, Lorenzen T, Hansen MS, et al. Effectiveness and drug adherence of biologic monotherapy in routine care of patients with rheumatoid arthritis: a cohort study of patients registered in the Danish biologics registry. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(12):2156-65.
69. Iannazzo S, Benucci M, Favalli EG. Tocilizumab after a first-line with anti-TNF in rheumatoid arthritis: a cost-consequence analysis in the Italian setting. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36(3):479-85.
70. Meissner B, Trivedi D, You M, Rosenblatt L. Switching of biologic disease modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis in a real world setting. *J Med Econ.* 2014;17(4):259-65.
71. Koga T, Okada A, Fukuda T, Hidaka T, Ishii T, Ueki Y, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies are the strongest predictor of clinically relevant radiographic progression in rheumatoid arthritis patients achieving remission or low disease activity: A post hoc analysis of a nationwide cohort in Japan. *PLoS One.* 2017;12(5):e0175281.
72. Martin-Mola E, Balsa A, Garcia-Vicuna R, Gomez-Reino J, Gonzalez-Gay MA, Sanmarti R, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and their value for predicting responses to biologic agents: a review. *Rheumatol Int.* 2016;36(8):1043-63.
73. Sokolove J, Schiff M, Fleischmann R, Weinblatt ME, Connolly SE, Johnsen A, et al. Impact of baseline anti-cyclic citrullinated peptide-2 antibody concentration on efficacy outcomes following treatment with subcutaneous abatacept or adalimumab: 2-year results from the AMPLE trial. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(4):709-14.
74. Gottenberg JE, Courvoisier DS, Hernandez MV, Iannone F, Lie E, Canhao H, et al. Brief Report: Association of Rheumatoid Factor and Anti-Citrullinated Protein Antibody Positivity With Better Effectiveness of Abatacept: Results From the Pan-European Registry Analysis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(6):1346-52.
75. Wunderlich C, Oliviera I, Figueiredo CP, Rech J, Schett G. Effects of DMARDs on citrullinated peptide autoantibody levels in RA patients-A longitudinal analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;46(6):709-14.

76. Guerne PA, Weisman MH. Palindromic rheumatism: part of or apart from the spectrum of rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 1992;93(4):451-60.
77. Koskinen E, Hannonen P, Sokka T. Palindromic rheumatism: longterm outcomes of 60 patients diagnosed in 1967-84. *J Rheumatol.* 2009;36(9):1873-5.
78. Sanmarti R, Cabrera-Villalba S, Gomez-Puerta JA, Ruiz-Esquide V, Hernandez MV, Salvador G, et al. Palindromic rheumatism with positive anticitrullinated peptide/protein antibodies is not synonymous with rheumatoid arthritis. A longterm followup study. *J Rheumatol.* 2012;39(10):1929-33.
79. Russell AS, Devani A, Maksymowych WP. The role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting progression of palindromic rheumatism to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2006;33(7):1240-2.
80. Mankia K, Emery P. Palindromic rheumatism as part of the rheumatoid arthritis continuum. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(11):687-95.
81. Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Jhangri GS, Ramos-Remus C, Russell AS, Suarez-Almazor ME. Prognostic factors for the development of rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases in patients with palindromic rheumatism. *J Rheumatol.* 1999;26(3):540-5.
82. Ellingwood L, Schieir O, Valois MF, Bartlett SJ, Bessette L, Boire G, et al. Palindromic Rheumatism Frequently Precedes Early Rheumatoid Arthritis: Results From an Incident Cohort. *ACR Open Rheumatol.* 2019;1(10):614-9.
83. Corominas H, Narvaez J, Diaz-Torne C, Salvador G, Gomez-Caballero ME, de la Fuente D, et al. Diagnostic and therapeutic delay of rheumatoid arthritis and its relationship with health care devices in Catalonia. The AUDIT study. *Reumatol Clin.* 2016;12(3):146-50.
84. Powell A, Davis P, Jones N, Russell AS. Palindromic rheumatism is a common disease: comparison of new-onset palindromic rheumatism compared to new-onset rheumatoid arthritis in a 2-year cohort of patients. *J Rheumatol.* 2008;35(6):992-4.
85. Wajed MA, Brown DL, Currey HL. Palindromic rheumatism. Clinical and serum complement study. *Ann Rheum Dis.* 1977;36(1):56-61.
86. 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;42(8):972-5.
87. Tamai M, Kawakami A, Iwamoto N, Arima K, Aoyagi K, Eguchi K. Contribution of anti-CCP antibodies, proximal interphalangeal joint involvement, HLA-DRB1 shared epitope, and PADI4 as risk factors for the development of rheumatoid arthritis in palindromic rheumatism. *Scand J Rheumatol.* 2010;39(4):287-91.
88. Emad Y, Anbar A, Abo-Elyoun I, El-Shaarawy N, Al-Hanafi H, Darwish H, et al. In palindromic rheumatism, hand joint involvement and positive anti-CCP antibodies predict RA development after 1 year of follow-up. *Clin Rheumatol.* 2014;33(6):791-7.
89. Khabbazi A, Hajjaliloo M, Kolahi S, Soroosh M, Esalatmanesh K, Sharif S. A multicenter study of clinical and laboratory findings of palindromic rheumatism in Iran. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(4):427-30.
90. Cabrera-Villalba S, Gomara MJ, Canete JD, Ramirez J, Salvador G, Ruiz-Esquide V, et al. Differing specificities and isotypes of anti-citrullinated peptide/protein antibodies in palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):141.
91. Gran JT, Husby G, Thorsby E. HLA antigens in palindromic rheumatism, nonerosive rheumatoid arthritis and classical rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1984;11(2):136-40.

92. Fisher LR, Kirk A, Awad J, Festenstein H, Alonso A, Perry JD, et al. HLA antigens in palindromic rheumatism and palindromic onset rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1986;25(4):345-8.
93. Barbieri P, Ciompi ML, Menicucci A, Pasero G. HLA antigens in palindromic rheumatism. An Italian study. *Clin Rheumatol*. 1988;7(4):470-3.
94. Maksymowych WP, Suarez-Almazor ME, Buenviaje H, Cooper BL, Degeus C, Thompson M, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in relation to occurrence of palindromic rheumatism and its progression to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(11):2319-26.
95. Kim SK, Lee HS, Lee KW, Bae SC, Jun JB. Palindromic rheumatism: different genetic background implies a distinct disease entity. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(11):1539-40.
96. Canete JD, Arostegui JI, Queiro R, Gratacos J, Hernandez MV, Larrosa M, et al. An unexpectedly high frequency of MEFV mutations in patients with anti-citrullinated protein antibody-negative palindromic rheumatism. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2784-8.
97. Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Salvador G, Ruiz-Esqvide V, Hernandez MV, Inciarte-Mundo J, et al. Is there subclinical synovitis in patients with palindromic rheumatism in the intercritical period? a clinical and ultrasonographic study according to anticitrullinated protein antibody status. *J Rheumatol*. 2014;41(8):1650-5.
98. Mankia K, D'Agostino MA, Wakefield RJ, Nam JL, Mahmood W, Grainger AJ, et al. Identification of a distinct imaging phenotype may improve the management of palindromic rheumatism. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(1):43-50.
99. Bugatti S, Caporali R, Manzo A, Sakellariou G, Rossi S, Montecucco C. Ultrasonographic and MRI characterisation of the palindromic phase of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(4):625-6.
100. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):787-9.
101. Hench P, Rosenberg EF. Palindromic rheumatism. A 'new' oft recurring disease of joints (arthritis, peri-arthritis, para- arthritis) apparently producing no articular residues. Report of thirty- four cases; its relation to angio- neural arthrosis', 'allergic rheumatism' and rheumatoid arthritis. *Archives of Internal Medicine*. 1944;73:293-321.
102. Mattingly S. Palindromic rheumatism. *Ann Rheum Dis*. 1966;25(4):307-17.
103. Pasero G, Barbieri P. Palindromic rheumatism: you just have to think about it! *Clin Exp Rheumatol*. 1986;4(3):197-9.
104. Chen HH, Chao WC, Liao TL, Lin CH, Chen DY. Risk of autoimmune rheumatic diseases in patients with palindromic rheumatism: A nationwide, population-based, cohort study. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201340.
105. Ansell BM, Bywaters EG. Palindromic Rheumatism. *Ann Rheum Dis*. 1959;18:330.
106. Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Jhangri G, Russell AS, Suarez-Almazor ME. Decreased progression to rheumatoid arthritis or other connective tissue diseases in patients with palindromic rheumatism treated with antimalarials. *J Rheumatol*. 2000;27(1):41-6.
107. Neshar G, Mates M. Palindromic rheumatism: effect of dietary manipulation. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18(3):375-8.
108. Eliakim A, Neumann L, Horowitz J, Buskila D, Kleiner-Baumgarten A, Sukenik S. Palindromic rheumatism in Israel--a disease entity? A survey of 34 patients. *Clin Rheumatol*. 1989;8(4):507-11.
109. Hannonen P, Mottonen T, Oka M. Palindromic rheumatism. A clinical survey of sixty patients. *Scand J Rheumatol*. 1987;16(6):413-20.

110. Golding DN. Sulphasalazine for palindromic rheumatism. *Br J Rheumatol*. 1988;27(1):79.
111. Youssef W, Yan A, Russell AS. Palindromic rheumatism: a response to chloroquine. *J Rheumatol*. 1991;18(1):35-7.
112. Myasoedova E, Crowson CS, Turesson C, Gabriel SE, Matteson EL. Incidence of extraarticular rheumatoid arthritis in Olmsted County, Minnesota, in 1995-2007 versus 1985-1994: a population-based study. *J Rheumatol*. 2011;38(6):983-9.
113. Spagnolo P, Lee JS, Sverzellati N, Rossi G, Cottin V. The Lung in Rheumatoid Arthritis: Focus on Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(10):1544-54.
114. Bongartz T, Nannini C, Medina-Velasquez YF, Achenbach SJ, Crowson CS, Ryu JH, et al. Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1583-91.
115. Hyldgaard C, Hilberg O, Pedersen AB, Ulrichsen SP, Lokke A, Bendstrup E, et al. A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: comorbidity and mortality. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1700-6.
116. Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, Majka DS, Lazar AA, Derber LA, et al. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis Rheum*. 2010;62(11):3161-72.
117. Wilsher M, Voight L, Milne D, Teh M, Good N, Kolbe J, et al. Prevalence of airway and parenchymal abnormalities in newly diagnosed rheumatoid arthritis. *Respir Med*. 2012;106(10):1441-6.
118. Duarte AC, Porter JC, Leandro MJ. The lung in a cohort of rheumatoid arthritis patients-an overview of different types of involvement and treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(11):2031-8.
119. Carmona L, Gonzalez-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M, Tena X, Sanmarti R. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):897-900.
120. 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;62(8):722-7.
121. Koduri G, Norton S, Young A, Cox N, Davies P, Devlin J, et al. Interstitial lung disease has a poor prognosis in rheumatoid arthritis: results from an inception cohort. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(8):1483-9.
122. Olson AL, Swigris JJ, Sprunger DB, Fischer A, Fernandez-Perez ER, Solomon J, et al. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease-associated mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(3):372-8.
123. Gabbay E, Tarala R, Will R, Carroll G, Adler B, Cameron D, et al. Interstitial lung disease in recent onset rheumatoid arthritis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2 Pt 1):528-35.
124. Saag KG, Kolluri S, Koehnke RK, Georgou TA, Rachow JW, Hunninghake GW, et al. Rheumatoid arthritis lung disease. Determinants of radiographic and physiologic abnormalities. *Arthritis Rheum*. 1996;39(10):1711-9.
125. Sparks JA, He X, Huang J, Fletcher EA, Zaccardelli A, Friedlander HM, et al. Rheumatoid Arthritis Disease Activity Predicting Incident Clinically Apparent Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease: A Prospective Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1472-82.
126. Gochuico BR, Avila NA, Chow CK, Novero LJ, Wu HP, Ren P, et al. Progressive preclinical interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med*. 2008;168(2):159-66.

REFERENCIAS

127. Kelly CA, Saravanan V, Nisar M, Arthanari S, Woodhead FA, Price-Forbes AN, et al. Rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: associations, prognostic factors and physiological and radiological characteristics--a large multicentre UK study. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(9):1676-82.
128. Doyle TJ, Patel AS, Hatabu H, Nishino M, Wu G, Osorio JC, et al. Detection of Rheumatoid Arthritis-Interstitial Lung Disease Is Enhanced by Serum Biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(12):1403-12.
129. Spagnolo P, Grunewald J, du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):416-28.
130. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell KV, Lesage S. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol*. 2017;198(6):2223-31.
131. Wang D, Zhang J, Lau J, Wang S, Taneja V, Matteson EL, et al. Mechanisms of lung disease development in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(10):581-96.
132. Ytterberg AJ, Joshua V, Reynisdottir G, Tarasova NK, Rutishauser D, Ossipova E, et al. Shared immunological targets in the lungs and joints of patients with rheumatoid arthritis: identification and validation. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1772-7.
133. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):733-48.
134. Lee HK, Kim DS, Yoo B, Seo JB, Rho JY, Colby TV, et al. Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest*. 2005;127(6):2019-27.
135. Nurmi HM, Purokivi MK, Karkkainen MS, Kettunen HP, Selander TA, Kaarteenaho RL. Variable course of disease of rheumatoid arthritis-associated usual interstitial pneumonia compared to other subtypes. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):107.
136. Tsuchiya Y, Takayanagi N, Sugiura H, Miyahara Y, Tokunaga D, Kawabata Y, et al. Lung diseases directly associated with rheumatoid arthritis and their relationship to outcome. *Eur Respir J*. 2011;37(6):1411-7.
137. Fischer A, Solomon JJ, du Bois RM, Deane KD, Olson AL, Fernandez-Perez ER, et al. Lung disease with anti-CCP antibodies but not rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Respir Med*. 2012;106(7):1040-7.
138. Kinder BW, Collard HR, Koth L, Daikh DI, Wolters PJ, Elicker B, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7):691-7.
139. Fischer A, West SG, Swigris JJ, Brown KK, du Bois RM. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: a call for clarification. *Chest*. 2010;138(2):251-6.
140. Vij R, Noth I, Strek ME. Autoimmune-featured interstitial lung disease: a distinct entity. *Chest*. 2011;140(5):1292-9.
141. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2655-66.
142. Paulin F, Doyle TJ, Fletcher EA, Ascherman DP, Rosas IO. Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Shared Mechanistic and Phenotypic Traits Suggest Overlapping Disease Mechanisms. *Rev Invest Clin*. 2015;67(5):280-6.

143. Juge PA, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(23):2209-19.
144. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011;364(16):1503-12.
145. Juge PA, Borie R, Kannengiesser C, Gazal S, Revy P, Wemeau-Stervinou L, et al. Shared genetic predisposition in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2017;49(5).
146. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;356(13):1317-26.
147. Samara KD, Trachalaki A, Tsitoura E, Koutsopoulos AV, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, et al. Upregulation of citrullination pathway: From Autoimmune to Idiopathic Lung Fibrosis. *Respir Res*. 2017;18(1):218.
148. Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR, Harle P, Myers JL, Turesson C, et al. Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(1):70-5.
149. Solomon JJ, Matson S, Kelmenson LB, Chung JH, Hobbs SB, Rosas IO, et al. IgA Antibodies Directed Against Citrullinated Protein Antigens Are Elevated in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*. 2019.
150. Li FJ, Surolia R, Li H, Wang Z, Kulkarni T, Liu G, et al. Autoimmunity to Vimentin Is Associated with Outcomes of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Immunol*. 2017;199(5):1596-605.
151. Kahloon RA, Xue J, Bhargava A, Csizmadia E, Otterbein L, Kass DJ, et al. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):768-75.
152. Katsumata M, Hozumi H, Yasui H, Suzuki Y, Kono M, Karayama M, et al. Frequency and clinical relevance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in idiopathic interstitial pneumonias. *Respir Med*. 2019;154:102-8.
153. Shaw M, Collins BF, Ho LA, Raghu G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur Respir Rev*. 2015;24(135):1-16.
154. Remy-Jardin M, Remy J, Cortet B, Mauri F, Delcambre B. Lung changes in rheumatoid arthritis: CT findings. *Radiology*. 1994;193(2):375-82.
155. Dawson JK, Fewins HE, Desmond J, Lynch MP, Graham DR. Fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis as assessed by high resolution computed tomography, chest radiography, and pulmonary function tests. *Thorax*. 2001;56(8):622-7.
156. Bradley B, Branley HM, Egan JJ, Greaves MS, Hansell DM, Harrison NK, et al. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 2008;63 Suppl 5:v1-58.
157. Xie HQ, Zhang WW, Sun S, Chen XM, Yuan SF, Gong ZH, et al. A simplified lung ultrasound for the diagnosis of interstitial lung disease in connective tissue disease: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):93.
158. Uehara T, Takeno M, Hama M, Yoshimi R, Suda A, Ihata A, et al. Deep-inspiration breath-hold 18F-FDG-PET/CT is useful for assessment of connective tissue disease associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol*. 2016;26(1):121-7.
159. Zhu J, Zhou Y, Chen X, Li J. A metaanalysis of the increased risk of rheumatoid arthritis-related pulmonary disease as a result of serum anticitrullinated protein antibody positivity. *J Rheumatol*. 2014;41(7):1282-9.

160. Kinoshita F, Hamano H, Harada H, Kinoshita T, Igishi T, Hagino H, et al. Role of KL-6 in evaluating the disease severity of rheumatoid lung disease: comparison with HRCT. *Respir Med.* 2004;98(11):1131-7.
161. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2013;80(1):29-33.
162. Zhang Y, Lu N, Peloquin C, Dubreuil M, Neogi T, Avina-Zubieta JA, et al. Improved survival in rheumatoid arthritis: a general population-based cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(2):408-13.
163. Abhishek A, Nakafero G, Kuo CF, Mallen C, Zhang W, Grainge MJ, et al. Rheumatoid arthritis and excess mortality: down but not out. A primary care cohort study using data from Clinical Practice Research Datalink. *Rheumatology (Oxford).* 2018;57(6):977-81.
164. Sparks JA, Chang SC, Liao KP, Lu B, Fine AR, Solomon DH, et al. Rheumatoid Arthritis and Mortality Among Women During 36 Years of Prospective Follow-Up: Results From the Nurses' Health Study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2016;68(6):753-62.
165. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(2):350-7.
166. Solomon JJ, Chung JH, Cosgrove GP, Demoruelle MK, Fernandez-Perez ER, Fischer A, et al. Predictors of mortality in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 2016;47(2):588-96.
167. Solomon JJ, Ryu JH, Tazelaar HD, Myers JL, Tuder R, Cool CD, et al. Fibrosing interstitial pneumonia predicts survival in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD). *Respir Med.* 2013;107(8):1247-52.
168. Steinbrecher UP, Fisher M, Witztum JL, Curtiss LK. Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. *J Lipid Res.* 1984;25(10):1109-16.
169. Stram AR, Payne RM. Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(21):4063-73.
170. Jaisson S, Pietremont C, Gillery P. Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. *Adv Clin Chem.* 2018;84:1-38.
171. Velasquez MT, Ramezani A, Raj DS. Urea and protein carbamylation in ESRD: surrogate markers or partners in crime? *Kidney Int.* 2015;87(6):1092-4.
172. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 2007;13(10):1176-84.
173. Sirpal S. Myeloperoxidase-mediated lipoprotein carbamylation as a mechanistic pathway for atherosclerotic vascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2009;116(9):681-95.
174. Roberts JM, Veres PR, Cochran AK, Warneke C, Burling IR, Yokelson RJ, et al. Isocyanic acid in the atmosphere and its possible link to smoke-related health effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(22):8966-71.
175. Kassa RM, Kasensa NL, Monterroso VH, Kayton RJ, Klimek JE, David LL, et al. On the biomarkers and mechanisms of konzo, a distinct upper motor neuron disease associated with food (cassava) cyanogenic exposure. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(3):571-8.

176. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GM, Drijfhout JW, Huizinga TW, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev.* 2014;13(3):225-30.
177. Ramirez R, Carracedo J, Nogueras S, Buendia P, Merino A, Canadillas S, et al. Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(6):781-8.
178. Schreier SM, Steinkellner H, Jirovetz L, Hermann M, Exner M, Gmeiner BM, et al. S-carbamoylation impairs the oxidant scavenging activity of cysteine: its possible impact on increased LDL modification in uraemia. *Biochimie.* 2011;93(4):772-7.
179. Cerami A. Review of the development of cyanate as a drug in the treatment of sickle cell anemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1974;241(0):538-44.
180. Gorisse L, Pietrement C, Vuiblet V, Schmelzer CE, Kohler M, Duca L, et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):1191-6.
181. Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am J Kidney Dis.* 2014;64(5):793-803.
182. Lapko VN, Smith DL, Smith JB. Methylation and carbamylation of human gamma-crystallins. *Protein Sci.* 2003;12(8):1762-74.
183. Tang WH, Shrestha K, Wang Z, Borowski AG, Troughton RW, Klein AL, et al. Protein carbamylation in chronic systolic heart failure: relationship with renal impairment and adverse long-term outcomes. *J Card Fail.* 2013;19(4):219-24.
184. Holzer M, Gauster M, Pfeifer T, Wadsack C, Fauler G, Stiegler P, et al. Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(12):2337-46.
185. Apostolov EO, Ray D, Savenka AV, Shah SV, Basnakian AG. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1852-7.
186. Crist RD, Grisolia S, Bettis CJ, Grisolia J. Carbamoylation of proteins following administration to rats of carbamoyl phosphate and cyanate and effects on memory. *Eur J Biochem.* 1973;32(1):109-16.
187. Kimani S, Moterroso V, Lasarev M, Kipruto S, Bukachi F, Maitai C, et al. Carbamoylation correlates of cyanate neuropathy and cyanide poisoning: relevance to the biomarkers of cassava cyanogenesis and motor system toxicity. *Springerplus.* 2013;2:647.
188. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020;110:102392.
189. Mydel P, Wang Z, Brisslert M, Hellvard A, Dahlberg LE, Hazen SL, et al. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2010;184(12):6882-90.
190. Turunen S, Koivula MK, Risteli L, Risteli J. Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3345-52.
191. Rigby WFC, Skopelja-Gardner S, Jones JD. Editorial: Anti-Citrullinated Protein Antibody, Anti-Carbamylated Protein Antibody, and Rheumatoid Arthritis: Azurophilic Granules Sing the Blues. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(12):2251-5.
192. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(42):17372-7.

193. Ospelt C, Bang H, Feist E, Camici G, Keller S, Detert J, et al. Carbamylation of vimentin is inducible by smoking and represents an independent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(7):1176-83.
194. Nakabo S, Hashimoto M, Ito S, Furu M, Ito H, Fujii T, et al. Carbamylated albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(7):1217-26.
195. Reed E, Jiang X, Kharlamova N, Ytterberg AJ, Catrina AI, Israelsson L, et al. Antibodies to carbamylated alpha-enolase epitopes in rheumatoid arthritis also bind citrullinated epitopes and are largely indistinct from anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):96.
196. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40.
197. Turunen S, Huhtakangas J, Nousiainen T, Valkealahti M, Melkko J, Risteli J, et al. Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):239.
198. Nakabo S, Ohmura K, Akizuki S, Murakami K, Nakashima R, Hashimoto M, et al. Activated neutrophil carbamylates albumin via the release of myeloperoxidase and reactive oxygen species regardless of NETosis. *Mod Rheumatol*. 2020;30(2):345-9.
199. Tsumiyama K, Miyazaki Y, Shiozawa S. Self-organized criticality theory of autoimmunity. *PLoS One*. 2009;4(12):e8382.
200. Verheul MK, van Erp SJ, van der Woude D, Levarht EW, Mallat MJ, Verspaget HW, et al. Anti-carbamylated protein antibodies: a specific hallmark for rheumatoid arthritis. Comparison to conditions known for enhanced carbamylation; renal failure, smoking and chronic inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(8):1575-6.
201. Li X, Wang Z, Yi H, Xie J, Zhu N. Diagnostic Accuracy of Anti-Carbamylated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Lab*. 2019;65(12).
202. Shi J, Willemze A, Janssen GM, van Veelen PA, Drijfhout JW, Cerami A, et al. Recognition of citrullinated and carbamylated proteins by human antibodies: specificity, cross-reactivity and the 'AMC-Senshu' method. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):148-50.
203. Kumar S, Pangtey G, Gupta R, Rehan HS, Gupta LK. Assessment of anti-CarP antibodies, disease activity and quality of life in rheumatoid arthritis patients on conventional and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Reumatologia*. 2017;55(1):4-9.
204. Ajeganova S, van Steenberg HW, Verheul MK, Forslind K, Hafstrom I, Toes RE, et al. The association between anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies and radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a study exploring replication and the added value to ACPA and rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):112-8.
205. Humphreys JH, Verheul MK, Barton A, MacGregor AJ, Lunt M, Toes RE, et al. Anticarbamylated protein antibodies are associated with long-term disability and increased disease activity in patients with early inflammatory arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1139-44.
206. Figueiredo CP, Bang H, Cobra JF, Englbrecht M, Hueber AJ, Haschka J, et al. Antimodified protein antibody response pattern influences the risk for disease relapse in patients with rheumatoid arthritis tapering disease modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(2):399-407.

207. de Moel EC, Derksen V, Stoeken G, Trouw LA, Bang H, Goekoop RJ, et al. Baseline autoantibody profile in rheumatoid arthritis is associated with early treatment response but not long-term outcomes. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):33.
208. Spinelli FR, Pecani A, Ciciarello F, Colasanti T, Di Franco M, Miranda F, et al. Association between antibodies to carbamylated proteins and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):214.
209. Regueiro C, Ortiz AM, Boveda MD, Castaneda S, Gonzalez-Alvaro I, Gonzalez A. Association of high titers of anti-carbamylated protein antibodies with decreased bone mineral density in early arthritis patients. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202583.
210. Vidal-Bralo L, Perez-Pampin E, Regueiro C, Montes A, Varela R, Boveda MD, et al. Anti-carbamylated protein autoantibodies associated with mortality in Spanish rheumatoid arthritis patients. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180144.
211. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EW, Huizinga TW, Toes RE, Trouw LA, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):911-5.
212. Ten Brinck RM, van Steenberg HW, van Delft MAM, Verheul MK, Toes REM, Trouw LA, et al. The risk of individual autoantibodies, autoantibody combinations and levels for arthritis development in clinically suspect arthralgia. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(12):2145-53.
213. Alessandri C, Bartosiewicz I, Pendolino M, Mancini R, Colasanti T, Pecani A, et al. Anti-carbamylated protein antibodies in unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients: lack of correlation with anti-cyclic citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(6):824-30.
214. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EW, Huizinga TW, Hamann D, van Schaardenburg D, et al. Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(4):780-3.
215. Brink M, Verheul MK, Ronnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes RE, 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;17:25.
216. Verheul MK, Bohringer S, van Delft MAM, Jones JD, Rigby WFC, Gan RW, et al. Triple Positivity for Anti-Citrullinated Protein Autoantibodies, Rheumatoid Factor, and Anti-Carbamylated Protein Antibodies Conferring High Specificity for Rheumatoid Arthritis: Implications for Very Early Identification of At-Risk Individuals. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(11):1721-31.
217. Derksen VF, Ajeganova S, Trouw LA, van der Helm-van Mil AH, Hafstrom I, Huizinga TW, et al. Rheumatoid arthritis phenotype at presentation differs depending on the number of autoantibodies present. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(4):716-20.
218. Chimenti MS, Triggianese P, Nuccetelli M, Terracciano C, Crisanti A, Guarino MD, et al. Auto-reactions, autoimmunity and psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2015;14(12):1142-6.
219. Muller PC, Anink J, Shi J, Levarht EW, Reinards TH, Otten MH, et al. Anticarbamylated protein (anti-CarP) antibodies are present in sera of juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(12):2053-5.
220. Bergum B, Koro C, Delaleu N, Solheim M, Hellvard A, Binder V, et al. Antibodies against carbamylated proteins are present in primary Sjogren's syndrome and are associated with disease severity. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(8):1494-500.
221. Li Y, Jia R, Liu Y, Tang S, Ma X, Shi L, et al. Antibodies against carbamylated vimentin exist in systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. *Lupus*. 2020;29(3):239-47.

222. Favoino E, Prete M, Vettori S, Corrado A, Cantatore FP, Valentini G, et al. Anti-carbamylated protein antibodies and skin involvement in patients with systemic sclerosis: An intriguing association. *PLoS One*. 2018;13(12):e0210023.
223. Darrah E, Andrade F. Editorial: citrullination, and carbamylation, and malondialdehyde-acetaldehyde! Oh my! Entering the forest of autoantigen modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):604-8.
224. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS*. 2007;115(5):422-38; discussion 39.
225. 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;101(1):273-81.
226. Thiele GM, Duryee MJ, Anderson DR, Klassen LW, Mohring SM, Young KA, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adducts and anti-malondialdehyde-acetaldehyde antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):645-55.
227. Juarez M, Bang H, Hammar F, Reimer U, Dyke B, Sahbudin I, et al. Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1099-107.
228. Kampstra ASB, Dekkers JS, Volkov M, Dorjee AL, Hafkenscheid L, Kempers AC, et al. Different classes of anti-modified protein antibodies are induced on exposure to antigens expressing only one type of modification. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(7):908-16.
229. Kissel T, Reijm S, Slot LM, Cavallari M, Wortel CM, Vergroesen RD, et al. Antibodies and B cells recognising citrullinated proteins display a broad cross-reactivity towards other post-translational modifications. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(4):472-80.
230. Sanmarti R, Canete JD, Salvador G. Palindromic rheumatism and other relapsing arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2004;18(5):647-61.
231. van Delft MAM, Verheul MK, Burgers LE, Derksen V, van der Helm-van Mil AHM, van der Woude D, et al. The isotype and IgG subclass distribution of anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):190.
232. Scherer HU, Huizinga TWJ, Kronke G, Schett G, Toes REM. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(3):157-69.
233. Koppejan H, Trouw LA, Sokolove J, Lahey LJ, Huizinga TJ, Smolik IA, et al. Role of Anti-Carbamylated Protein Antibodies Compared to Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Indigenous North Americans With Rheumatoid Arthritis, Their First-Degree Relatives, and Healthy Controls. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(9):2090-8.
234. Ioan-Facsinay A, Willemze A, Robinson DB, Peschken CA, Markland J, van der Woude D, et al. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum*. 2008;58(10):3000-8.
235. Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Ronnelid J, et al. Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R13.
236. Brink M, Hansson M, Mathsson L, Jakobsson PJ, Holmdahl R, Hallmans G, et al. Multiplex analyses of antibodies against citrullinated peptides in individuals prior to development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):899-910.
237. Kelmenson LB, Wagner BD, McNair BK, Frazer-Abel A, Demoruelle MK, Bergstedt DT, et al. Timing of Elevations of Autoantibody Isotypes Prior to Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(2):251-61.

238. Katz SJ, Russell AS. Palindromic rheumatism: a pre-rheumatoid arthritis state? *J Rheumatol*. 2012;39(10):1912-3.
239. de Hair MJ, Landewe RB, van de Sande MG, van Schaardenburg D, van Baarsen LG, Gerlag DM, et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(10):1654-8.
240. Savic S, Mistry A, Wilson AG, Barcenas-Morales G, Doffinger R, Emery P, et al. Autoimmune-autoinflammatory rheumatoid arthritis overlaps: a rare but potentially important subgroup of diseases. *RMD Open*. 2017;3(2):e000550.
241. Janssen KM, de Smit MJ, Brouwer E, de Kok FA, Kraan J, Altenburg J, et al. Rheumatoid arthritis-associated autoantibodies in non-rheumatoid arthritis patients with mucosal inflammation: a case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:174.
242. Fragoulis GE, Conway R, Nikiphorou E. Methotrexate and interstitial lung disease: controversies and questions. A narrative review of the literature. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(11):1900-6.
243. Herrinton LJ, Harrold LR, Liu L, Raebel MA, Taharka A, Winthrop KL, et al. Association between anti-TNF-alpha therapy and interstitial lung disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013;22(4):394-402.
244. Curtis JR, Sarsour K, Napalkov P, Costa LA, Schulman KL. Incidence and complications of interstitial lung disease in users of tocilizumab, rituximab, abatacept and anti-tumor necrosis factor alpha agents, a retrospective cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:319.
245. Zhu H, Zhao LJ, Zhou Y, Chen Y. [Significance of anti-carbamylated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2019;51(6):1003-7.
246. England BR, Duryee MJ, Roul P, Mahajan TD, Singh N, Poole JA, et al. Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts and Antibody Responses in Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1483-93.
247. Inui N, Enomoto N, Suda T, Kageyama Y, Watanabe H, Chida K. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in lung diseases associated with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 2008;41(13):1074-7.
248. Skare TL, Nakano I, Escuissiato DL, Batistetti R, Rodrigues Tde O, Silva MB. Pulmonary changes on high-resolution computed tomography of patients with rheumatoid arthritis and their association with clinical, demographic, serological and therapeutic variables. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51(4):325-30, 36-7.
249. Lugli EB, Correia RE, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:9.
250. Wang Z, DiDonato JA, Buffa J, Comhair SA, Aronica MA, Dweik RA, et al. Eosinophil Peroxidase Catalyzed Protein Carbamylation Participates in Asthma. *J Biol Chem*. 2016;291(42):22118-35.
251. Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(2):287-301.
252. Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, Cloonan SM. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy*. 2018;14(2):221-32.
253. Holers VM, Demoruelle MK, Kuhn KA, Buckner JH, Robinson WH, Okamoto Y, et al. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(9):542-57.

254. Demoruelle MK, Wilson TM, Deane KD. Lung inflammation in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2020;294(1):124-32.
255. Nagy G, Roodenrijs NM, Welsing PM, Kedves M, Hamar A, van der Goes MC, et al. EULAR definition of difficult-to-treat rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2020.
256. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(5):276-89.
257. Freites-Nunez D, Baillet A, Rodriguez-Rodriguez L, Nguyen MVC, Gonzalez I, Pablos JL, et al. Efficacy, safety and cost-effectiveness of a web-based platform delivering the results of a biomarker-based predictive model of biotherapy response for rheumatoid arthritis patients: a protocol for a randomized multicenter single-blind active controlled clinical trial (PREDIRA). *Trials.* 2020;21(1):755.
258. Alten R, Mariette X, Lorenz HM, Nusslein H, Galeazzi M, Navarro F, et al. Predictors of abatacept retention over 2 years in patients with rheumatoid arthritis: results from the real-world ACTION study. *Clin Rheumatol.* 2019;38(5):1413-24.
259. Harrold LR, Litman HJ, Connolly SE, Alemao E, Kelly S, Rebello S, et al. Comparative Effectiveness of Abatacept Versus Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Are Anti-CCP Positive in the United States Corrona Registry. *Rheumatol Ther.* 2019;6(2):217-30.
260. Herrero-Beaumont G, Martinez Calatrava MJ, Castaneda S. Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile. *Reumatol Clin.* 2012;8(2):78-83.
261. Kumar R, Piantoni S, Boldini M, Garrafa E, Bazzani C, Fredi M, et al. Anti-carbamylated protein antibodies as a clinical response predictor in rheumatoid arthritis patients treated with abatacept. *Clin Exp Rheumatol.* 2020.
262. Trouw L, Connolly S, Johnsen A, Ye J, Maldonado M, Toes R, et al. The impact of therapy on anti-carbamylated protein antibody isotypes and serostatus in patients with early rheumatoid arthritis treated with Abatacept and methotrexate. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:135.
263. Verheul MK, Vierboom MPM, Hart BA, Toes REM, Trouw LA. Anti-carbamylated protein antibodies precede disease onset in monkeys with collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):246.
264. Aletaha D, Funovits J, Keystone EC, Smolen JS. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56(10):3226-35.
265. Smolen JS, Van Der Heijde DM, St Clair EW, Emery P, Bathon JM, Keystone E, et al. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):702-10.
266. Lopez-Romero P, Martinez-Gamboa L, Bang H, de la Torre I, Holzkamper T, Feist E. Assessment of the association of baseline anti-CarbV and anti-MCV antibodies with response to treatment and radiographic progression in an RA population treated with either methotrexate or baricitinib: post-hoc analyses from RA-BEGIN. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):193.
267. Jiang X, Trouw LA, van Wesemael TJ, Shi J, Bengtsson C, Kallberg H, et al. Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1761-8.
268. Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, et al. Retraction: Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med.* 2019;216(1):245.

REFERENCIAS

269. Steen J, Forsstrom B, Sahlstrom P, Odowd V, Israelsson L, Krishnamurthy A, et al. Recognition of Amino Acid Motifs, Rather Than Specific Proteins, by Human Plasma Cell-Derived Monoclonal Antibodies to Posttranslationally Modified Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(2):196-209.
270. Sahlstrom P, Hansson M, Steen J, Amara K, Titcombe PJ, Forsstrom B, et al. Different hierarchies of anti-modified protein autoantibody reactivities in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2020.
271. Lo KC, Sullivan E, Bannen RM, Jin H, Rowe M, Li H, et al. Comprehensive Profiling of the Rheumatoid Arthritis Antibody Repertoire. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(2):242-50.
272. Kongpachith S, Lingampalli N, Ju CH, Blum LK, Lu DR, Elliott SE, et al. Affinity Maturation of the Anti-Citrullinated Protein Antibody Paratope Drives Epitope Spreading and Polyreactivity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(4):507-17.

ADENDA

Publicaciones adicionales relacionadas a los temas de la tesis que han sido publicados durante el periodo de mi doctorado.

1. Castellanos-Moreira R, Rodriguez-Garcia SC, Haro I, Sanmarti R. Relationship between rheumatoid arthritis and interstitial lung disease is a 'two-way street'. Response to: 'Autoantibodies and interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: towards a 'mix-and-match' approach' by Alunno et al. *Ann Rheum Dis*. 2020.
2. Castellanos-Moreira R, Rodriguez-Garcia SC, Hernandez-Gonzalez F, Sellares J, Haro I, Sanmarti R. Is Auto-Antibody Expansion the Turning Point Between Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Rheumatoid Arthritis? *Chest*. 2020;158(4):1777-8.
3. Fernandez-Diaz C, Castaneda S, Melero-Gonzalez RB, Ortiz-Sanjuan F, Juan-Mas A, Carrasco-Cubero C, et al. Abatacept in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis: national multicenter study of 263 patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(12):3906-16.
4. Sanmarti R, Ramirez J, Castellanos-Moreira R, Cabrera-Villalba SR, Ruiz-Esquide V, Salvador G. Ultrasound findings in palindromic rheumatism. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(3): e30.