



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Pèptids sintètics i proteïnes amb modificacions post-traduccionals per a la detecció de biomarcadors en l'artritis reumatoide

Cristina García Moreno

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.

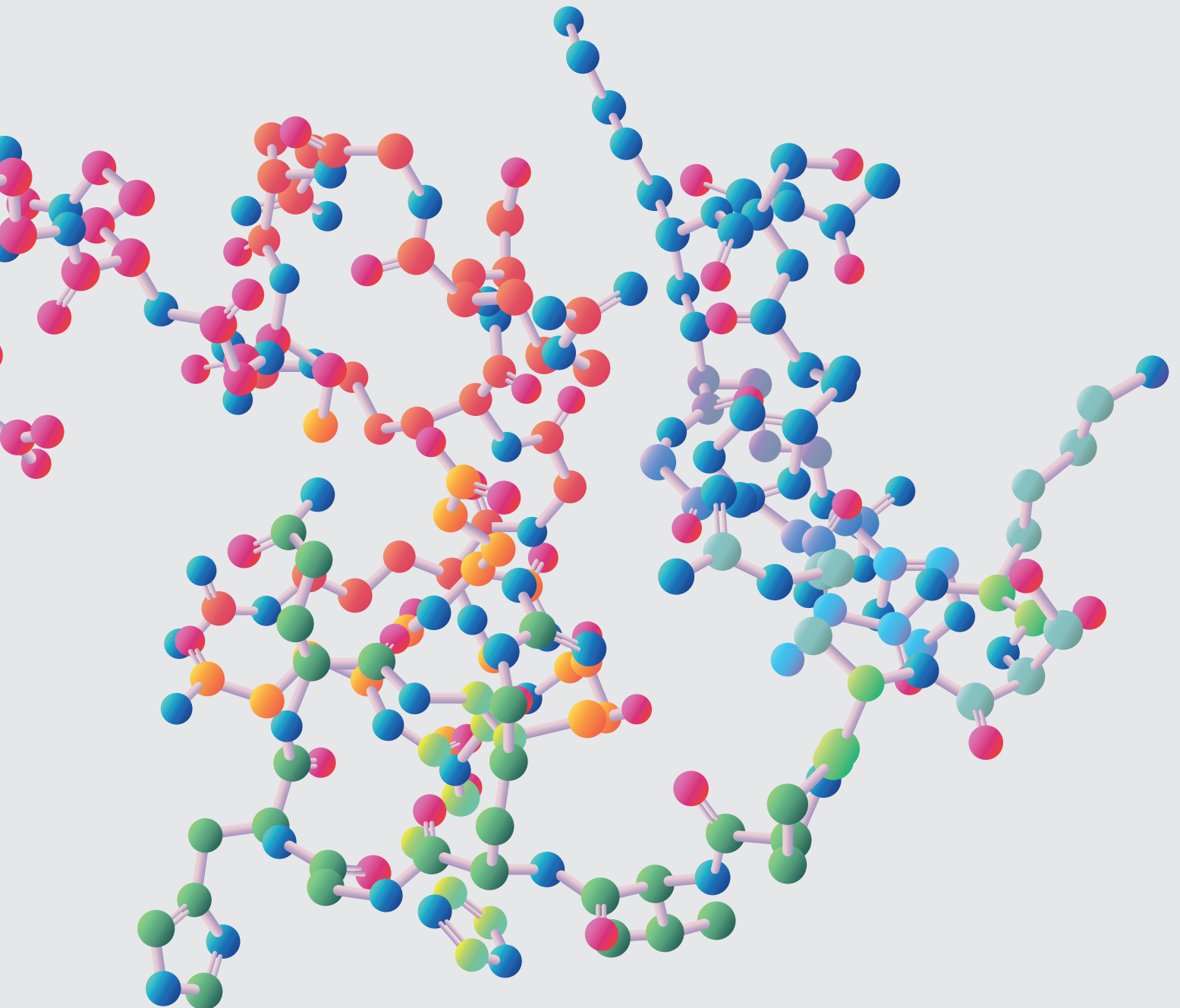
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad 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.

Tesi Doctoral

Pèptids sintètics i proteïnes amb modificacions post-traduccionals per a la detecció de biomarcadors en l'artritis reumatoide

Cristina García Moreno
Barcelona, 2022





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**PÈPTIDS SINTÈTICS I PROTEÏNES AMB MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS PER A LA
DETECCIÓ DE BIOMARCADORS EN L'ARTRITIS REUMATOIDE**

Memòria presentada per Cristina García i Moreno per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada a la Unitat de Síntesi i Aplicacions Biomèdiques de Pèptids, del
Departament de Química Biològica, de l'Institut de Química Avançada de Catalunya
(USiBAP, IQAC-CSIC)

Cristina García i Moreno
Doctoranda

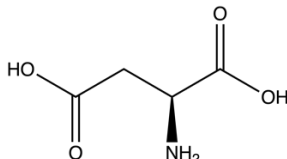
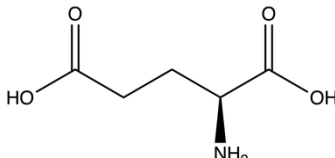
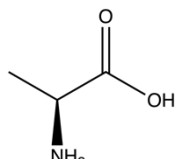
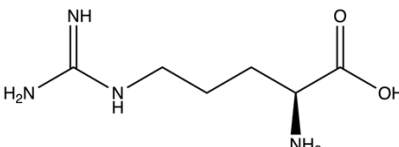
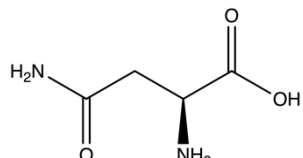
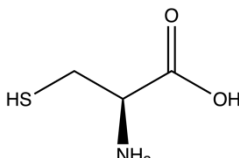
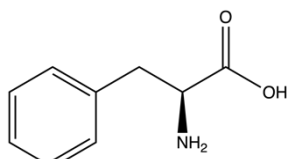
Dra. Isabel Haro Villar
Directora
USiBAP
IQAC-CSIC

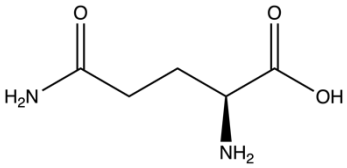
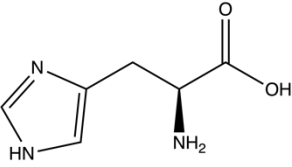
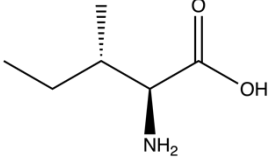
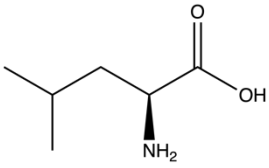
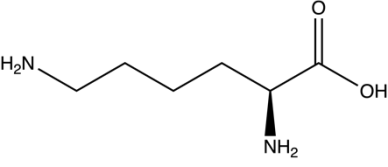
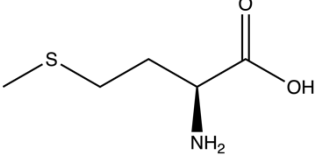
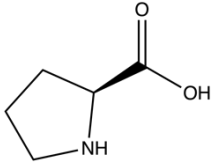
Dr. Raimon Sanmartí Sala
Director
Dept. de Medicina
Hospital Clínic

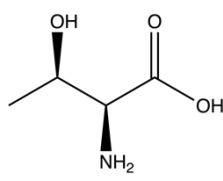
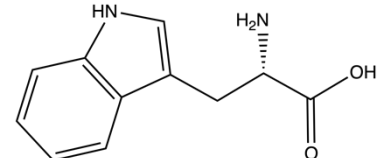
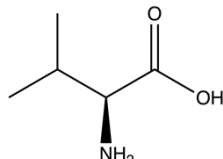
Dr. Jordi Yagüe Ribes
Tutor
Dept. de Biomedicina
Hospital Clínic

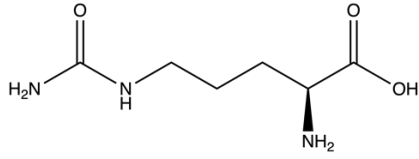
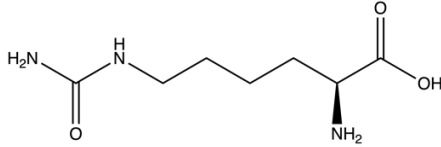
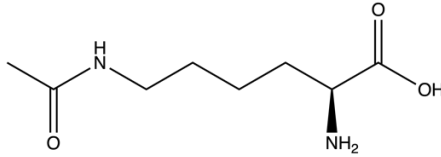
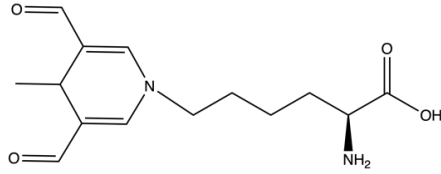
A la Pepeta i a l'Emilio

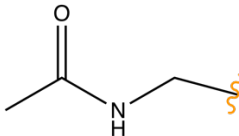
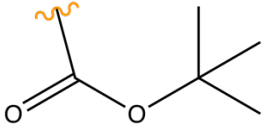
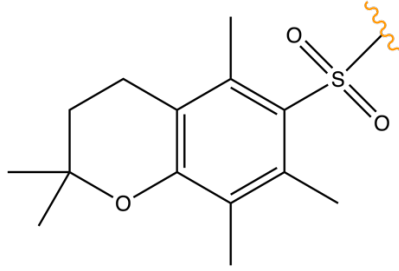
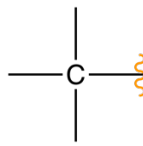
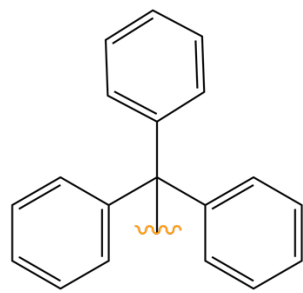
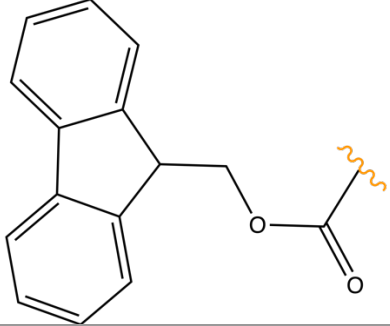
Estructures químiques

Aminoàcid	Abreviatura	Símbol	Estructura química
Àcid aspàrtic	Asp	D	
Àcid glutàmic	Glu	E	
Alanina	Ala	A	
Arginina	Arg	R	
Asparagina	Asn	N	
Cisteïna	Cys	C	
Fenilalanina	Phe	F	

Aminoàcid	Abreviatura	Símbol	Estructura química
Glutamina	Gln	Q	
Histidina	His	H	
Isoleucina	Ile	I	
Leucina	Leu	L	
Lisina	Lys	K	
Metionina	Met	M	
Prolina	Pro	P	

Aminoàcid	Abreviatura	Símbol	Estructura química
Treonina	Thr	T	
Triptòfan	Trp	W	
Valina	Val	V	

Aminoàcid original	Aminoàcid amb PTM	Abreviatura	Estructura química
Arginina	Citrul·lina	Cit	
Lisina	Homocitrul·lina	hCit	
Lisina	Acetil lisina	K(Ac)	
Lisina	Lisina-MAA	K(MAA)	

Aminoàcid	Grup protector	Grup protegit	Estructura grup protector
Cisteïna	Acetamidometil (Acm)	Cadena lateral	
Lisina, Triptòfan	Tert-butoxicarbonil (Boc)	Cadena lateral	
Arginina	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc)	Cadena lateral	
Àcid aspàrtic, Àcid glutàmic, Serina, Tirosina, Treonina	Tert-butil (tBu)	Cadena lateral	
Asparagina, Cisteïna, Glutamina, Histidina	Tritil (trt)	Cadena lateral	
Tots els aminoàcids	9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)	Extrem α -amino	

Abreviatures

Llistat d'abreviatures	
δ	Desplaçament químic
λ	Longitud d'ona
AA	Acetaldehid
aa	Aminoàcid
AAPA	Anticossos contra proteïnes/pèptids acetilats
Ab	Anticòs
Ac	Acetil
Acm	Acetamidometil
ACN	Acetonitril
AcOH	Àcid acètic
ACPA	Anticossos contra proteïnes/pèptids citrul·linats
ACR	Col·legi americà de reumatologia, de l'anglès <i>American College of Rheumatology</i>
Ag	Antigen
AMPA	Anticossos contra proteïnes/pèptids modificats
Anti-CarP	Anticossos contra proteïnes/pèptids carbamilats
Anti-CCP	Anticossos contra pèptid cíclic citrul·linat, de l'anglès <i>antibody against cyclic citrullinated peptide</i>
Anti-MAA	Anticossos contra proteïnes/pèptids amb adductes MAA
AP	Fosfatasa alcalina
AUC	Àrea sota la corba, de l'anglès <i>area under the curve</i>
Boc	Tert-butiloxicarbonil
BSA	Albúmina sèrica bovina, de l'anglès <i>bovine serum albumin</i>
CASPAR	Críteris de classificació per artritis psoriàsica, de l'anglès <i>classification criteria for psoriatic arthritis</i>
CCP	Pèptid cíclic citrul·linat, de l'anglès <i>cyclic citrullinated peptide</i>
CEP-1	Pèptid citrul·linat d' α -enolasa 1, de l'anglès <i>citrullinated α-enolase peptide 1</i>
CSA	Artràlgia clínicament sospitosa, de l'anglès <i>clinically suspected arthragia</i>
DIEA	N,N-Diisopropiletilamina
DIPCDI	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
ELISA	Assaig immunoenzimàtic en fase sòlida, de l'anglès <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI-MS	Espectrometria de masses amb ionització per electrospray, de l'anglès <i>electrospray ionization-mass spectrometry</i>
EULAR	Lliga europea contra el reumatisme, de l'anglès <i>european alliance of associations for rheumatology</i>
ExM	Manifestació extra articular, de l'anglès <i>extra-articular manifestation</i>
FAAB	2-formil-3(alquilamino)butanal
Fc	Fracció constant
FCS	Sèrum fetal boví, de l'anglès <i>fetal calf serum</i>
FIA	Anàlisi per injecció de flux, de l'anglès <i>flow injection analysis</i>
Fib	Fibrinogen
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
Fr	Valor de fronts
FR	Factor reumatoide
GWAS	Estudis d'associació de genoma complet, de l'anglès <i>genome wide association studies</i>
HATs	Histones acetil transferases
HATU	Hexafluorofosfat d'O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HDATs	Histona desacetilasa
Hexil-MAA	1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-piridindicarboxialdehid
HLA	Antigen leucocitari humà, de l'anglès <i>human leukocyte antigen</i>

HLA-DRβ1	Cadena β 1 de la molècula HLA-DR
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució, de l'anglès <i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Peroxidasa de rave picant, de l'anglès <i>horseradish peroxidase</i>
HSA	Albúmina sèrica humana, de l'anglès <i>human serum albumin</i>
Ig	Immunoglobulina
IgA	Immunoglobulina de l'isotip A
IgG	Immunoglobulina de l'isotip G
IgM	Immunoglobulina de l'isotip M
IL	Interleucina
ILD	Malaltia pulmonar intersticial, de l'anglès <i>interstitial lung disease</i>
IQR	Rang interquartílic, de l'anglès <i>interquartil range</i>
LYP	Tirosina fosfatasa limfoide, de l'anglès <i>lymphoid tyrosine phosphatase</i>
m/z	Relació massa/càrrega
MAA	Adductes de malondialdehid-acetaldehid, de l'anglès <i>malondialdehyde-acetaldehyde adducts</i>
MAP	Pèptid amb múltiples antígens, de l'anglès <i>multiple antigen peptide</i>
MCV	Vimentina mutada citrul·linada, de l'anglès <i>mutated citrullinated vimentin</i>
MDA	Malondialdehid
MDHDC	4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldèhid, també conegut com adducte MAA
MeOH	Metanol
MHC	Complex d'histocompatibilitat major, de l'anglès <i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Metal·loproteïnasa
MPO	Mieloperoxidasa
MS	Espectrometria de masses, de l'anglès <i>mass spectrometry</i>
NET	Trampes extracel·lulars de neutròfils, de l'anglès <i>neutrophil extracellular traps</i>
NGS	Seqüenciació de nova generació, de l'anglès <i>next generation sequencing</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida
OD	Densitat òptica, de l'anglès <i>optical density</i>
OPD	Orto-fenilendiamina
PAD	Peptidil arginina deiminasa
PADI4	Peptidil arginina deiminasa isoforma 4
PBS	Tampó fosfat salí, de l'anglès <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Proteïna C reactiva
PEG	Polietilenglicol
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilmroman-6-sulfonil
pNPP	Paranitrofenilfosfat
PTM	Modificació post-traduccional, de l'anglès <i>post-translational modification</i>
PTPN22	Proteïna tirosina fosfatasa no receptor tipus 22
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfoni
RA	Artritis reumatoide, de l'anglès <i>rheumatoid arthritis</i>
RANK	Receptor del factor nuclear B
RANK-L	Lligand del receptor del factor nuclear B
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROC	Corba de rendiment diagnòstic, de l'anglès <i>receiver operating characteristic</i>
ROS	Espècies reactives d'oxigen, de l'anglès <i>reactive oxygen species</i>
RP	Reumatisme palindròmic
SDS	Dodecil sulfat sòdic, de l'anglès <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SE	Epítot compartit, de l'anglès <i>shared epitope</i>
SNP	Polimorfisme de nucleòtid únic, de l'anglès <i>single nucleotide polymorphism</i>
SPPS	Síntesi de pèptids en fase sòlida, de l'anglès <i>solid phase peptide synthesis</i>
tBu	Tert-butil

TFA	Àcid trifluoroacètic
TIS	Triisopropilsilà
TLC	Cromatografia per capa fina, de l'anglès <i>thin layer chromatography</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMS	Tetrametilsilà
TNFα	Factor de necrosi tumoral- α , de l'anglès <i>tumor necrosis factor α</i>
TOF	Temps de vol, de l'anglès <i>time of Flight</i>
T_r	Temps de retenció
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometà
Trt	Trifenilmetil
UA	Unitats arbitràries
UPLC	Cromatografia líquida d'ultra pressió
VARA	Registre de veterans d'artritis reumatoide, de l'anglès <i>Veteran Affairs Rheumatoid Arthritis</i>
VPN	Valor predictiu negatiu
VPP	Valor predictiu positiu
VSG	Velocitat de sedimentació globular

Índex

INTRODUCCIÓ	1
1. Artritis reumatoide	1
1.1. Què és?	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Etiologia	2
2. Fisiopatologia i característiques clíniques	7
2.1. Característiques clíniques i etapes de la malaltia	7
2.2. Mecanismes fisiopatològics	8
2.3. Casos d'artritis reumatoide especialment greu	12
3. Autoanticossos en l'AR	17
3.1. Factor reumatoide	17
3.2. Autoanticossos contra pèptids/proteïnes modificades	18
4. Diagnòstic de l'AR	27
4.1. Característiques de les proves diagnòstiques	27
4.2. Criteris diagnòstics en l'AR	28
4.3. Determinació dels ACPAs	31
5. Reumatisme palindròmic	33
5.1. Què és?	33
5.2. Perfil biològic d'autoanticossos	33
5.3. Estudi PALABA	34
6. Pèptids sintètics i el seu ús en diagnòstic	35
6.1. Estudi i caracterització d'epítops	35
6.2. Ús dels pèptids sintètics com a antigens pel diagnòstic	38
6.3. Tipus d'immunoassaigs emprant pèptids sintètics com antigens	45
6.4. Tests actuals pel diagnòstic serològic en l'AR basats en l'ús de pèptids sintètics	51
OBJECTIUS	55
MATERIALS I MÈTODES	59
1. Preparació dels antigens modificats post-traduccionals: pèptids sintètics i proteïnes	65
1.1. Síntesi dels antigens peptídics amb diferents modificacions post-traduccionals	65
1.2. Ciclació dels pèptids	73
1.3. Purificació dels pèptids	74
1.4. Caracterització dels pèptids	74
2. Preparació dels antigens proteics	77
2.1. Proteïnes carbamilades	77
2.2. Proteïnes amb adductes de malondialdehid-acetaldehid (MAA)	78
3. Immunoassaigs per la determinació dels anticossos contra els diferents antigens amb modificacions post-traduccionals	83
3.1. Factors comuns dels diferents immunoassaigs	83
3.2. ELISA	86
3.3. Microarrays	93
4. Sèrums	99
4.1. Anàlisi de detecció d'ACPA's amb pèptids citrul·linats en suport de microarray	99
4.2. Anàlisi de detecció d'AMPAs amb pèptids quimèrics, proteïnes carbamilades i proteïnes modificades amb adductes de MAA	99
4.3. Anàlisi comparatiu de RP vs AR	100

RESULTATS	101
1. Disseny, preparació i desenvolupament de microarrays peptídics per la detecció d'anticossos contra pèptids/proteïnes citrul·linades en pacients d'artritis reumatoide	103
1.1 Síntesi i caracterització dels diferents pèptids quimèrics	103
1.2 Resultats de la determinació d'ACPA emprant ELISA com immunoassaig	108
1.3 Optimització del protocol d'immunoassaig dels microarrays peptídics	110
1.4 Resultats de la determinació d'ACPA emprant microarrays peptídics	113
1.5 Comparació dels dos mètodes d'immunoassaig	119
1.6 Comparació amb el test comercial CCP3	120
2. Pèptids quimèrics cíclics amb múltiples modificacions post-traduccionals com antígens per la detecció d'AMPAs en pacients d'artritis reumatoide greu	127
2.1 Optimització de la metodologia de l'ELISA	127
2.2 Síntesi de pèptids quimèrics homocitrul·linats i citrul·linats	130
2.3 Resposta AMPA i relació amb la malaltia pulmonar intersticial	134
2.4 Síntesi de diferents fragments de fibrina amb noves combinacions de modificacions post-traduccionals	135
2.5 Síntesi d'un pèptid quimèric triplement modificat	140
2.6 Estudi de la resposta AMPA en pacients amb malaltia articular greu	145
3. Preparació d'antígens amb adductes de malondialdehid-acetaldehid i determinació de la presència d'anti-MAA en pacients amb artritis reumatoide	147
3.1 Síntesi i caracterització del compost control: hexil-MAA	147
3.2 Modificació de les proteïnes i verificació de la formació d'adductes de MAA	148
3.3 Modificació del pèptid CFFCP-R i verificació de la correcta formació d'adductes de MAA en la seva estructura per obtenir el pèptid CFFCMaP	151
3.4 Determinació dels anticossos anti-MAA en pacients en la població d'AR i una població control	153
4. Comparació del perfil d'autoanticossos dels pacients de reumatisme palindròmic i artritis reumatoide amb antígens modificats post-traduccionalment	163
4.1 Obtenció dels antígens emprats en la detecció de la resposta AMPA	163
4.2 Determinació dels punts de tall per determinar la positivitat AMPA respecte diferents antígens	166
4.3 Comparació de les poblacions d'anàlisi	168
4.4 Resultats comparatius de la resposta AMPA en les dues poblacions d'anàlisi	169
DISCUSSIÓ	173
CONCLUSIONS	199
BIBLIOGRAFIA	203
ANNEXOS	225
Article 1	229
Article 2	253
Article 3	273
Comunicació EULAR 2022	277

Llistat de figures

Figura 1: Llistat d'aminoàcids presents als diferents al·lells a les posicions 11, 13, 70-74 del gen HLA-DRB1.	4
Figura 2: Evolució de les diferents etapes de l'AR basada en els criteris d'EULAR	7
Figura 3: Exemples de manifestacions extra-articulars i de diferents patologies o comorbiditats comuns en el context de l'AR.	14
Figura 4: Esquema del procés de citrul·linació.	19
Figura 5: Esquema del procés de carbamilació.	20
Figura 6: Esquema del procés d'acetilació.	22
Figura 7: Esquema del procés de formació d'adductes de MAA en els residus de lisina.	24
Figura 8: Representació dels tipus d'epítops que poden presentar-se.	36
Figura 9: Representació d'un exemple gràfic dels pèptids monomèrics i pèptids quimèrics	44
Figura 10: Representació gràfica de la unió antigen/anticòs que es dona en cadascun dels subtipus d'ELISA.	47
Figura 11: Muntatge emprat en la síntesi en fase sòlida de pèptids.	66
Figura 12: Esquema general del procediment de la síntesi en fase sòlida.	67
Figura 13: Esquema de la resina emprada, NovaSyn® TGR	68
Figura 14: Resultats possibles del test de Kaiser.	70
Figura 15: Resultats possibles del test de cloranil.	71
Figura 16: Exemple de la ciclació en una estructura peptídica derivada de la filagrina.	73
Figura 17: Comparació de la visió general del tipus d'assaig que es dona en (A) un format ELISA vs (B) un format microarray	83
Figura 18: Esquema dels passos d'un assaig ELISA indirecte.	84
Figura 19: Esquema representatiu de la unió del pèptid a plaques derivatitzades amb N-oxisuccinimida.	86
Figura 20: Procediment de preparació dels slides i immobilització del pèptid.	94
Figura 21: Esquemes de disseny dels microarrays.	96
Figura 22: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CFCEP.	105
Figura 23: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CEFCP.	106
Figura 24: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CVECP.	107
Figura 25: Anàlisi mitjançant corbes ROC dels pèptids CEFCP, CVECP i CFCEP.	109
Figura 26: Comparació dels resultats obtinguts amb els portaobjectes derivatitzats en les dues condicions d'anàlisi.	111
Figura 27: Comparació dels resultats obtinguts amb els slides amb el pèptid imprès en els dos tipus de tampó analitzats.	112
Figura 28: Representació gràfica de les intensitats de fluorescència obtingudes en les diferents combinacions de sèrum/tipus de pèptid.	113
Figura 29: Diagrama de flux explicatiu del procés de validació dels resultats obtinguts per cadascun dels pèptids testats en pacients d'AR, BS i PsA.	114
Figura 30: Anàlisi per corbes ROC dels resultats dels microarrays obtinguts en els pèptids citrul·linats quimèrics inclosos en l'assaig en les cohorts d'AR i BS.	116
Figura 31: Relació dels valors de unitats de fluorescència (RUs) obtinguts en els microarrays i les corresponents unitats de densitat òptica (OD) obtinguts en els assaigs d'ELISA.	119
Figura 32: Model de regressió lineal entre els dos assaigs estudiats.	120
Figura 33: Patrons de reactivitat envers els 8 pèptids quimèrics citrul·linats inclosos en l'assaig del múltiplex en les tres cohorts d'estudi (AR, BS i PsA).	126
Figura 34: Seqüència aminoacídica i espectre d'HPLC analític de cadascun dels pèptids confirmant un >95% de puresa.	128
Figura 35: Comparació de la variabilitat intra-assaig (A) i inter-assaig (B)	129
Figura 36: Espectre d'HPLC analític de cadascun dels pèptids confirmant un >95% de puresa.	131
Figura 37: Representació de les corbes ROC obtingudes amb els tres isotips d'estudi amb els antigens peptídics que combinen citrul·lina i homocitrul·lina.	132
Figura 38: Comparació dels resultats obtinguts en la cohort d'AR-ILD (n=37) vs AR-no ILD (n=141)	135
Figura 39: Mapa de calor de la reactivitat observada en unitats de densitat òptica dels 178 sèrums testats amb els 3 pèptids que presenten 1 PTM.	138
Figura 40: Mapa de calor de la reactivitat observada en unitats de densitat òptica dels 178 sèrums testats amb la resta de pèptids amb múltiples PTMs.	139
Figura 41: Caracterització per HPLC i espectrometria de masses del pèptid CFFCHAP.	141
Figura 42: Representació de les corbes ROC obtingudes amb els tres isotips d'estudi amb l'antigen peptídic CFFCHAP.	142

Figura 43: Comparació dels nivells de la resposta anti-AMPA vers l'especificitat fina CFFCHAP del grup de pacients d'AR-ILD i dels pacients d'AR sense ILD.	142
Figura 44: Anàlisi del solapament de les positivitats anti-AMPA detectada amb els diferents antigens quimèrics en els pacients d'AR-ILD.	144
Figura 45: Espectre de H ¹ -RMN del compost hexil-MAA.	147
Figura 46: Espectres d'emissió de fluorescència obtinguts de l'anàlisi de les dues proteïnes analitzades.	148
Figura 47: Recta de calibratge d'hexil-MAA.	149
Figura 48: Quantificació de la concentració proteica de les solucions obtingudes després de la reacció de formació d'adductes de MAA.	150
Figura 49: Esquema de la formació d'adductes de MAA sobre el pèptid CFFCP-R per obtenir el pèptid CFFCMaP.	151
Figura 50: Caracterització per HPLC i espectrometria de masses del pèptid CFFCMaP.	152
Figura 51: Comparació dels nivells d'anti-HSA-MAA obtinguts en la població d'AR de l'Hospital Clínic (n=178) i en el grup control (n=120).	154
Figura 52: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen l'albumina sèrica humana modificada per presentar adductes MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en CCP+ i CCP- i en el grup control.	157
Figura 53: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen l'HSA-MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control.	158
Figura 54: Títols d'anticossos anti-MAA-IgG detectats emprant com antigen el Fib-MAA en un grup de pacients d'AR (dividits en CCP+ i CCP-) i en el grup control.	159
Figura 55: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen el Fib-MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control.	160
Figura 56: Títols d'anticossos anti-MAA-IgG detectats emprant com antigen el pèptid CFFCMaP en un grup de pacients d'AR (dividits en CCP+ i CCP-) i en el grup control.	161
Figura 57: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen el pèptid CFFCMaP en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control.	162
Figura 58: Estructura primària del pèptid CFFHP.	163
Figura 59: Cromatograma obtingut de l'anàlisi d'aminoàcids d'una mostra de proteïna (FCS) control i la seva versió carbamilada (FCS-CarP).	164
Figura 60: Caracterització per HPLC i espectrometria de masses del pèptid CFFHP.	165
Figura 61: Corbes ROC del pèptid CFFHP pels diferents isotips.	166
Figura 62: Corbes ROC del dos antigens proteïcs: FCS-CarP i Fib-CarP pels diferents isotips.	167
Figura 63: Comparació dels nivells anti-CarP-IgA o anti-AMPA-IgA en els pacients de RP i AR emprant diferents antigens.	170

Llistat de taules

Taula 1: Criteris classificatoris d'AR establerts al 1987 pel Col·legi Americà de Reumatologia	28
Taula 2: Criteris establerts al 2010 per part d'ACR/EULAR pel diagnòstic de l'AR.	29
Taula 3: Reactius, dissolvents i altres productes emprats en la síntesi, purificació i caracterització dels pèptids i relació de cases comercials on s'han obtingut.	61
Taula 4: Reactius, dissolvents i altres productes emprats en els diferents immunoassaigs i relació de cases comercials on s'han obtingut.	62
Taula 5: Relació d'equips emprats durant la realització dels diferents experiments i marques/models corresponents.	63
Taula 6: Etapes de rentat i per assecatge de la peptidil-resina després de la síntesi	72
Taula 7: Relació dels passos d'ELISA (numeració d'acord als passos explicats a la Figura 18) i els tamps emprats en cadascun	85
Taula 8: Taula resum dels diferents protocols d'ELISA que s'han emprat durant la realització d'aquesta tesi en funció del tipus d'antigen presentat.	92
Taula 9: Estructures primàries dels pèptids quimèrics citrul·linats derivats de les proteïnes fibrina, filagrina, vimentina i enolasa emprats als assaigs inclosos en aquest apartat.	104
Taula 11: Resultats estadístics obtinguts de l'anàlisi dels pèptids CFCEP, CVECP i CEFCP	108
Taula 12: Número de sèrums descartats i inclosos en les diferents cohorts d'estudi incloses en l'assaig (AR, BS i PsA)	115
Taula 13: Sensibilitats de cadascun dels diferents pèptids inclosos en l'assaig multiplex	117
Taula 14: Positivitat observada per cadascun dels pèptids analitzats en els diferents grups inclosos en l'assaig.	118
Taula 15: Resultats de la comparació estadística de la sensibilitat individual de cada pèptid testat i els resultats obtinguts en el mateix grup de sèrums analitzats pel test comercial CCP3.	121
Taula 16: Anàlisi de l'especificitat del test multiplex desenvolupat en comparació als resultats obtinguts amb el test ELISA comercial CCP3	124
Taula 17: Relació de positivitats simultànies detectades envers les diferents especificitats fines incloses en el microarray en les diferents cohorts d'estudi	126
Taula 18: Relacions m/z teòriques i experimentals dels dos pèptids emprats en l'assaig de comparació dels mètodes d'unio a la placa d'ELISA.	129
Taula 19: Seqüències aminoacídiques, rendiment d'escissió (R_{esc}), rendiment de ciclació + purificació ($R_{cic+pur}$) i rendiment de síntesi (R_{sin}) dels tres pèptids citrul·linats/homocitrul·linats.	130
Taula 20: Relació de m/z teòriques i experimentals dels diferents pèptids quimèrics inclosos a l'assaig.	131
Taula 21: Valors del punt de tall determinat per cada antigen amb una especificitat del 95%	133
Taula 22: Resum de la resposta anti-ACPA i anti-AMPA observada en la població d'AR (n=178).	134
Taula 23: Seqüències primàries de les diferents versions del pèptid d' α -fibrina (617-631) amb PTMs, i rendiments d'escissió, purificació i síntesi.	136
Taula 24: Relació de m/z esperades i obtingudes dels diferents pèptids derivats d' α -fibrina (617-631).	137
Taula 25: Resposta anti-AMPA observada en la comparació de la població d'AR-ILD (n=37) vs AR-no ILD (n=141).	143
Taula 26: Resposta anti-AMPA observada en la comparació de la població amb destrucció articular greu (Larsen \geq 18, n=90) vs destrucció articular lleu (Larsen < 18, n=88).	146
Taula 27: Comparació dels resultats obtinguts en la població d'estudi de l'Hospital Clínic (n=178) vs VARA (n=1720), i VAMC (n=284).	155
Taula 28: Comparació de la positivitat anti-MAA testada amb diferents antigens entre el grup CCP (+) i CCP (-) de tres estudis diferents.	156
Taula 29: Valors dels punt de tall de positivitat emprats en les determinacions de la presència d'AMPAs duts a terme amb diferents antigens.	167
Taula 30: Comparació de les dades principals de les dues cohorts d'anàlisis: RP (n=45) vs AR (n=125).	168
Taula 31: Positivitat i nivells mitjans de la resposta anti-CarP en els pacients d'AR vs RP de recent diagnòstic analitzada amb els diferents antigens.	171
Taula 32: Positivitat i nivells mitjans de la resposta anti-AMPA en pacients d'AR vs RP de recent diagnòstic analitzada amb els diferents antigens.	172

Introducció

1. ARTRITIS REUMATOIDE

1.1. Què és?

L'artritis reumatoide (AR) és una malaltia inflamatòria crònica de naturalesa autoimmunitària¹. És una malaltia complexa, d'etiologia desconeguda en la que estan implicats factors genètics i ambientals i en la qual l'alteració del sistema immunitari juga un paper principal en la seva patogènesis². La principal manifestació clínica és la presència d'una poliartritis simètrica (inflamació de la membrana sinovial) d'evolució crònica amb tendència a la destrucció i deformitat articular, que pot ocasionar una discapacitat progressiva i pèrdua de la qualitat de la vida del pacient^{3,4}. A més de l'afectació articular, poden existir manifestacions extra-articulars (ExM) com els nòduls reumatoide, malaltia pulmonar intersticial o afectació ocular entre d'altres⁵.

L'estratègia actual del tractament consisteix en la realització d'un diagnòstic precoç i l'inici d'una teràpia efectiva el més aviat possible, mentre es manté un control estricte de la malaltia. Aquesta estratègia, denominada "treat-to-target"⁶, quan és efectuada de forma precoç ha demostrat ser efectiva. En molts dels pacients no s'aconsegueix la curació però sí la remissió clínica de la malaltia i s'evita la destrucció articular⁷.

La presentació clínica és heterogènia i es pot classificar els pacients en funció de diferents paràmetres. Una de les maneres més esteses de dur a terme la classificació és en base a la presència o absència de biomarcadors serològics distintius d'aquesta malaltia. Es pot discriminar entre l'AR seropositiva, en la qual els pacients presenten anticossos característics de la malaltia, que normalment està associada a un fenotip amb una major destrucció òssia, pitjor progressió i més mortalitat⁸ i la seronegativa, en general menys greu, més heterogènia i a voltes amb un diagnòstic clínic encara més difícil⁹.

Els biomarcadors més estudiats i rellevants són el factor reumatoide (FR) i un tipus d'autoanticossos que tenen com a diana les proteïnes/pèptids citrul·linats (ACPAs, anticossos contra proteïnes/pèptids citrul·linats). Aproximadament el 70-75% dels pacients d'AR presenten la forma seropositiva (FR+ i/o ACPA+) mentre que el percentatge restant de pacients, no presenta aquest tipus d'autoanticossos i conforma, per ara, el grup d'AR considerada seronegativa.

Això podria variar ja que recentment s'han descobert nous tipus d'autoanticossos contra altres modificacions post-traduccionals (PTMs, de l'anglès *post-translational modifications*) com la homocitrul·linació (també anomenada carbamilació), l'acetilació o la formació d'adductes de malondialdehid-acetaldehid en certs residus d'aminoàcids presents en proteïnes del teixit sinovial. La seva detecció en diferents poblacions d'AR les situa com a possibles biomarcadors i podrien ajudar a identificar respostes d'autoanticossos en el perfil serològic dels pacients fins ara classificats seronegatius. Els autoanticossos contra aquestes modificacions reben el nom, respectivament, d'anticossos contra proteïnes carbamilades (anti-CarP), anticossos contra proteïnes acetilades (AAPA) i anticossos contra proteïnes modificades amb adductes de MAA (anti-MAA).

1.2. Epidemiologia

La prevalença global estimada de l'AR es del 0.5-1%³, però s'observen petits canvis en funció de la localització de la població analitzada. Per exemple, l'estudi de la prevalença a diferents regions d'Europa confirma que aquesta es manté entre els percentatges esmentats però és lleugerament més baixa en els països del sud d'Europa que en els països nòrdics^{10,11}. Altres estudis epidemiològics fets en diferents àrees del món suggereixen que aquests valors són extrapolables i es mantenen en un rang similar¹². Destaca una prevalença més alta de la malaltia, de fins al 5-6% en algunes subpoblacions de Natius Americans¹³.

1.3. Etiologia

Es desconeix l'etiologia de l'AR, però s'han pogut determinar una sèrie de factors tant ambientals com genètics que confereixen un major risc a patir-la. La interacció entre aquests factors podria ser el desencadenant per l'inici de la resposta autoimmunitària observada. A continuació es descriuen alguns dels factors més rellevants.

1.3.1. Factors genètics

La importància del component genètic en la malaltia s'ha fet evident ja que alguns estudis amb bessons han demostrat que l'heretabilitat de la malaltia es troba al voltant del 60%¹⁴. Aquest terme fa referència a la proporció de variació d'un tret en una població que és atribuïble a factors genètics hereditaris¹⁵. Alguns estudis han determinat que la heretabilitat és comparable entre el grup de pacients ACPA (+) i el grup de pacients ACPA (-)^{14,16} mentre que en un altre estudi posterior es van descriure diferències entre els dos grups, afirmant que en el grup de pacients

ACPA (+), aquest valor d'heretabilitat arribava fins al 50% i en el grup ACPA (-) era inferior i només explicava fins al 20%¹⁷.

Els estudis d'associació de genomes complets (GWAS, de l'anglès *genome wide association studies*) han permès determinar que hi ha fins a 100 loci que confereixen risc de patir AR¹⁸. S'ha determinat també que múltiples variants genètiques d'aquests loci que estan associades a un risc de patir AR es troben en regions no codificants del genoma. Això suggereix que els gens identificats fins al moment no són causants únics de la malaltia sinó que són múltiples variacions que contribueixen a l'aparició del fenotip però sense explicar-ne la causa¹⁹.

Entre els factors genètics més rellevants en relació a la susceptibilitat a l'AR trobem els gens de l'antigen leucocitari humà (HLA, de l'anglès *human leukocyte antigen*)²⁰, que són una família de gens que codifiquen proteïnes de superfície del sistema immunitari que estan relacionades amb el procés de presentació d'antígens. L'associació genètica descrita més important en relació a l'AR és la que s'ha trobat amb diferents al·lels del gen HLA-DRB1, que codifica per la cadena β del complex d'histocompatibilitat major de tipus II (MHC-II). La susceptibilitat a patir AR s'ha descrit en pacients que presenten diferents al·lels que codifiquen per unes seqüències d'aminoàcids similars entre les posicions 70 i 74 del gen HLA-DRB1²¹ (Figura 1). També s'ha descrit la importància dels aminoàcids que es troben en les posicions 11 i 13 d'aquest mateix gen²². Aquests al·lels, de forma conjunta, han rebut el nom d'al·lels de l'epítoc compartit i quan un pacient els presenta, es considera que presenta l'HLA-SE (de l'anglès *shared epitope*, SE).

Els aminoàcids que es troben en aquestes posicions en els al·lels identificats com de risc presenten càrrega neta positiva o neutra i poden promoure la unió selectiva de pèptids artritogènics (com els pèptids citrul·linats) afavorint l'aparició d'una resposta autoimmunitària contra aquest tipus d'estructures. Els al·lels que confereixen un major risc són el HLA-DRB1*04^{23,24}, HLA-DRB1*01²⁵, HLA-DRB1*10 i HLA-DRB1*14. Aquests al·lels codifiquen les seqüències consens dels 5 aminoàcids del HLA-SE: ⁷⁰QRRRAA⁷⁴, ⁷⁰RRRAA⁷⁴ i ⁷⁰QKRAA⁷⁴^{22,26,27}. Els diferents al·lels es troben en diferents freqüències en les diferents poblacions mundials²⁸⁻³¹.

		Posició dins l'HLA-DRB1							
		11	13	70	71	72	73	74	
Al·lels HLA-DRB1 relacionats amb l'AR	*01:01	L	F	Q	R	R	A	A	Susceptibilitat major a l'AR: Augment del factor de risc
	*01:02	L	F	Q	R	R	A	A	
	*04:01	V	H	Q	K	R	A	A	
	*04:04	V	H	Q	R	R	A	A	
	*04:05	V	H	Q	R	R	A	A	
	*04:08	V	H	Q	R	R	A	A	
	*10:01	V	F	R	R	A	A	A	
	*14:02	S	S	Q	R	R	A	A	
	*01:03	L	F	D	E	R	A	A	Susceptibilitat menor a l'AR: "efecte protector"
	*04:02	V	H	D	E	R	A	A	
	*11:02	S	S	D	E	R	A	A	
	*11:03	S	S	D	E	R	A	A	
	*13:01	S	S	D	E	R	A	A	
	*13:02	S	S	D	E	R	A	A	

Aa amb càrrega (+)	Aa neutres	Aa amb càrrega (-)
--------------------	------------	--------------------

Figura 1: Llistat d'aminoàcids presents als diferents al·lels a les posicions 11, 13, 70-74 del gen HLA-DRB1. Relació amb la seva associació respecte al risc o protecció que confereixen en relació a patir AR seropositiva. Representació de l'efecte de la càrrega dels diferents aminoàcids en l'augment o protecció del risc en l'AR. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com.

El segon component genètic més important descrit en l'AR és la presència d'un al·lel determinat del gen PTPN22, que codifica per la proteïna limfoide tirosina fosfatasa anomenada Lyp³². La presència d'un polimorfisme de nucleòtids simple (SNP, de l'anglès *single nucleotide polymorphism*) que rep el nom de rs24766011, i que consisteix en el canvi d'una citosina per una guanina en la posició 1858 (C1858T) en l'al·lel de PTPN22 resulta en la substitució de l'aminoàcid arginina de la posició 620 per un aminoàcid triptòfan (R620W). Aquesta tirosina fosfatasa juga un paper en l'eliminació de l'activació de cèl·lules T i en la producció d'anticossos dependent de cèl·lules T³³.

1.3.2. Factors ambientals

Diferents estudis recents han descrit factors ambientals que contribueixen al risc i estan associats amb l'AR³⁴. Entre ells destaca, per sobre de tots, el tabaquisme. L'associació d'aquest hàbit amb la susceptibilitat a l'AR es va descobrir de forma inesperada en un estudi en el qual s'estava analitzant l'efecte dels anticonceptius en aquesta malaltia reumàtica³⁵. Des de llavors, aquesta associació s'ha pogut confirmar en diferents cohorts i s'ha establert també que el risc persisteix inclús fins a 10-20 anys després de deixar de fumar^{36,37}. S'ha vist que fumar durant molts anys afecta més que el nombre de cigarretes que es fumen al dia en relació al risc de patir AR³⁸ però

també s'ha establert que existeix un efecte de la dosi, és a dir, que com més cigarretes al dia durant més anys es fumi, major és el risc³⁹.

El tabaquisme es relaciona sobretot amb la presència d'AR seropositiva, especialment en aquells pacients que presenten al·lels de l'epítot compartit que els predisposen, fet que indica que hi ha una interacció entre el component genètic i l'ambiental⁴⁰.

S'han descrit associacions amb altres factors ambientals que fan augmentar el risc de desenvolupar AR com són la inhalació de pols⁴¹ o les alteracions a nivell de les mucoses com a conseqüència de canvis en la microbiota intestinal o infeccions^{42,43}. Aquestes alteracions estarien relacionades amb la pèrdua de tolerància que s'hipotetitza que és el primer pas del desenvolupament de l'AR⁴⁴. A nivell de les mucoses és destacable el paper que podria tenir el bacteri *Porphyromonas gingivalis*, un dels causants de la periodontitis que té capacitat de citrul·linar proteïnes de forma independent degut a que presenta un enzim propi de la família de les peptidil arginina deiminases (PAD)⁴⁵. Altres bacteris, com l'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* podrien promoure també la hipercitrul·linació, però ho fan de forma dependent de cèl·lules humanes ja que indueixen la citrul·linació per part dels neutròfils⁴⁶. Aquest bacteri també està relacionat amb casos greus de periodontitis. Hi ha evidències epidemiològiques de l'associació de la periodontitis i l'AR, especialment l'AR seropositiva i podria ser a conseqüència dels processos de citrul·linació que les dues malalties presenten en comú^{47,48}. Així doncs, una disrupció de les membranes mucoses bucals podria suposar un factor de risc important.

1.3.3. Sexe

En general, les dones tenen un risc fins a 3 vegades més elevat que els homes de patir AR⁴⁹. Aquestes diferències podrien venir donades per diferències genètiques i per canvis hormonals. S'associa el fet de no tenir fills amb un augment del risc d'AR mentre que l'embaràs es relaciona amb una remissió de la malaltia tot i que sol anar acompanyat d'un empitjorament en el moment del post-part. La major freqüència de dones que pateixen AR s'atribueix, en part, a l'efecte de l'estrogen en el sistema immunitari, tot i que el paper d'aquest factor és encara controvertit^{50,51}.

2. FISIOPATOLOGIA I CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques

2.1. Característiques clíniques i etapes de la malaltia

L'AR és una malaltia o síndrome clínic que es presenta amb una alta heterogeneïtat. El fet que es desconeixi amb certesa quin és l'inici i els processos que es donen durant els moments previs al diagnòstic i inclús quan ja està diagnosticada fa especialment complicat poder descriure de forma cronològica els diferents esdeveniments que es poden dur a terme tant a nivell articular com sistèmic. Basant-se en la observació clínic de grups grans de pacients en estadis diferents de la malaltia, membres la Lliga Europea d'Associacions de Reumatologia (EULAR, en anglès *European Allegiance of Associations for Rheumatology*) es van reunir i consensuar quins són els estadis en els quals es pot subdividir la malaltia. Aquests estadis inicialment eren 6 i, tot i que en principi semblen ben definits, s'observa que hi ha casos on s'entrellacen i no es poden diferenciar clarament⁵². Els estadis són els següents (Figura 2):

- 1) Presència de factors genètics de risc que predisposen a patir AR
- 2) Presència de factors ambientals que predisposen a patir AR
- 3) Presència d'autoimmunitat sistèmica associada amb l'AR
- 4) Presència de símptomes però en absència d'artritis clínic
- 5) Presència d'artritis indiferenciada
- 6) Presència d'artritis reumatoide diagnosticada



Figura 2: Evolució de les diferents etapes de l'AR basada en els criteris d'EULAR^{53,54}. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

Tot i que es van establir aquestes fases definides, també van deixar clar que no tots els pacients han de passar per aquestes fases i que potser no ho fan sempre en aquest ordre. Això és remarcable ja que per exemple, tot el grup de pacients fins ara considerats d'AR seronegativa no

compleixen el criteri o pas 3 que estaria definit com presència de signes d'autoimmunitat com els ACPAs que servien per definir aquest punt.

En publicacions posteriors, EULAR parla de 5 estadis, unificant així els punts 1 i 2, que clarament es poden donar de forma simultània i que de fet, segons els estudis publicats al moment, només de forma conjunta podrien explicar una progressió de la malaltia. També de forma posterior a aquesta primera classificació, i després d'una anàlisi de la literatura, es va treballar en l'establiment del concepte conegut com artràlgia sospitada clínicament (CSA, de l'anglès *clinically suspected arthralgia*)⁵⁴. Els pacients que presenten CSA, i que es troben en el punt 4, pateixen de diferents símptomes a nivell articular però sense presentar artritis i es considera que estan en un risc alt de progressió cap a l'AR⁵⁵. Definir bé aquests casos podria ajudar a fer el tractament adequat i evitar la progressió cap als passos 5 i 6.

2.2. Mecanismes fisiopatològics

L'etiologia i els diferents mecanismes fisiopatològics que es coneix o s'especula que es donen al llarg del desenvolupament de la patologia estan bastant diferenciats entre l'AR seropositiva i la seronegativa. En el cas de l'AR seronegativa, aquests mecanismes son menys compresos i es considera que probablement siguin molt més heterogenis que en la forma seropositiva.

2.2.1. Artritis reumatoide seropositiva

La detecció d'ACPA's en els sèrums de pacients ha representat un gran avenç en el diagnòstic, pronòstic i coneixement de la patogènesis de la malaltia. El seu estudi va permetre determinar que aquest tipus d'autoanticossos estan presents en els pacients fins i tot anys abans de presentar cap símptoma clínic i que la seva aparició és gradual, ja que es comencen normalment a presentar nivells baixos i amb una restricció dels epítops reconeguts i a mesura que passa el temps, aquests nivells augmenten alhora que es reconeixen epítops citrul·linats que provenen de proteïnes diverses, en el denominat fenomen d'expansió antigènica⁵⁶. El fet que hi ha molt pocs individus que comencin a presentar anticossos després de manifestar símptomes clínics va fer pensar que els autoanticossos eren més una causa que una conseqüència de la malaltia⁵⁷.

Amb el coneixement actual, la hipòtesi és que l'inici de la malaltia es donaria per un trencament de la tolerància cap a proteïnes pròpies amb modificacions post-traduccionals que desencadenaria la resposta autoimmunitària.

En un ambient amb proteïnes presents de forma natural en els teixits però modificades post-traduccionament (citrul·linades) com a conseqüència de la presència de tòxics com el tabac o modificades per l'acció de bacteris, els pacients que tenen susceptibilitat genètica desenvoluparien una resposta immunitària aberrant. La presència de diferents gens promouria una eficaç presentació dels antígens citrul·linats, i en conseqüència la pèrdua de tolerància cap a proteïnes pròpies que acabaria desembocant en una resposta immunitària alterada⁵⁷. No s'ha pogut definir el teixit en el qual es donarien aquests processos, però s'hipotetitzava que podria ser en algun teixit extra-articular, més concretament al pulmó (mucosa respiratòria), punt on convergirien alguns d'aquests diferents factors⁵⁸.

Com a conseqüència del tabaquisme, les mucoses estarien inflamades i en aquest punt seria on es donaria una major citrul·linació i presentació d'antígens citrul·linats. Donen suport aquesta hipòtesi també els estudis que indiquen que el tabaquisme és un estímul positiu per l'expressió de PAD, l'enzim encarregat de la citrul·linació de les proteïnes⁵⁹. Després de la citrul·linació o de la inducció d'altres modificacions post-traduccionals, tal i com ja s'ha descrit, els pèptids amb PTMs s'unirien al MHC amb major afinitat pels que presenten l'epítot compartit donant lloc a la presentació d'aquests antígens a les cèl·lules T. Aquestes alhora estimularien les cèl·lules B, encarregades de sintetitzar diferents anticossos que inclourien els ACPAs^{3,60}.

L'expansió de la resposta immunitària es donaria durant la resposta de les cèl·lules B contra els diferents antígens. En aquest punt es donaria el fenomen que es coneix com a canvi de classe, on es passen a generar altres isotips de immunoglobulina, i també es donaria una maduració de l'afinitat dels anticossos⁶¹. Aquest procés es donaria en centres germinals, ja sigui als pulmons, a altres mucoses com l'intestinal o fins i tot després de la seva migració, en centres germinals ectòpics que s'han identificat a les diferents articulacions⁶²⁻⁶⁴. En els estadis previs a la manifestació de l'AR es dona una expansió gran dels ACPAs, que és clau per entendre com la malaltia podria acabar provocant afectacions en teixits diferents al del seu origen^{63,65}. Alteracions en les mucoses i problemes en la permeabilitat podrien ser les causes per les quals les cèl·lules pro-inflamatòries del sistema immunitari viatgin fins a les articulacions⁶⁶.

La presència dels ACPAs a nivell sistèmic s'ha pogut detectar anys abans de la detecció clínica de l'AR, en el període que es coneix com autoimmunitat sistèmica⁶³. S'ha pogut demostrar que els ACPAs estan implicats en diferents processos que poden explicar la seva rellevància en les articulacions. S'ha descrit la presència de complexos immunitaris que contenen ACPA i fibrinogen

citrul·linat que indueixen la secreció del factor de necrosis tumoral (TNF- α), una citocina pro-inflamatòria^{64,67}. Els ACPAs també són capaços d'unir-se a la superfície dels osteoclasts, induint així el procés d'osteoclastogènesi que resulta en la degradació dels ossos⁶⁸. A més, també podrien estar implicats en la inducció d'altres respostes autoimmunitàries com la captació de neutròfils mitjançant la formació de trampes de neutròfils extracel·lulars (NETs, de l'anglès *neutrophil extracellular traps*)⁶⁹, de manera que ajudaria a la perpetuació de la inflamació⁷⁰.

També en les articulacions, en les primeres setmanes després de l'aparició de símptomes i del diagnòstic, s'ha demostrat que hi ha infiltració d'un gran nombre de cèl·lules del sistema immunitari, dominades per cèl·lules T CD4⁺ i macròfags. És en aquest punt on sembla que es comença a donar la destrucció articular, a la qual contribueixen principalment cèl·lules com els neutròfils o mastòcits mitjançant l'alliberament de citocines^{71,72}. A més, s'hi expressen diferents enzims com les metal·lo proteïnases de matriu, que estan implicades en la destrucció del teixit⁷³. S'ha observat també una activació de l'osteoclastogènesi per part dels limfòcits T, que produeixen RANK-L, el lligand necessari per la seva activació⁷⁴. S'estableix per tant un estat clarament pro-inflamatori i que es retro-alimenta. És aquesta inflamació persistent la que acaba portant a la destrucció final del teixit i a les alteracions en les articulacions que provoquen la pèrdua de funcionalitat en els pacients que la pateixen si no són tractats a temps⁷⁵.

La hipòtesi de l'inici de l'AR en els pulmons té diferents arguments a favor com el descobriment de la presència enriquida d'ACPA's en pulmons de pacients d'AR d'inici ACPA (+) i l'observació de canvis macroscòpics en el teixit pulmonar⁷⁰ o com infiltracions de cèl·lules inflamatòries en pacients d'AR precoç seropositiva que no s'observen en pacients sans o amb AR precoç seronegativa⁷⁶. A més, també s'ha demostrat que pacients d'AR precoç seropositiva presenten respostes immunitàries del tipus IgA⁷³, que són importants a l'inici i que a més persisteixen i s'ha observat que una proporció alta de pacients amb AR presenten lesions inflamatòries subclíniques⁷⁶. La presència d'ACPA-IgA i FR-IgA suggereix que hi ha una estimulació de la mucosa que es manté, des de l'inici i durant les fases posteriors⁵⁷. El descobriment d'antígens citrul·linats comuns tant en els pulmons com les articulacions també contribueixen com a argument en favor dels esdeveniments que es donen en les dues parts del cos i que donarien suport a aquesta teoria⁷⁷. Tot i que la mucosa pulmonar sembla clau, altres mucoses com l'intestinal també podrien estar implicades en desregulacions del sistema immunitari promovent un estat pro-inflamatori com a conseqüència d'una disbiosi⁷⁸.

2.2.2. Artritis reumatoide seronegativa

Inicialment s'entenia l'AR seronegativa com aquella que englobava tots els pacients d'AR que no presentessin FR sobretot de la classe IgM, però el descobriment dels ACPAs ha fet re-definir aquest concepte i que ara es consideri seronegativa en el cas de no presentar cap dels dos tipus d'anticòs⁷⁹. S'ha descobert la presència d'anti-CarP en aproximadament el 15% de pacients fins ara anomenats seronegatius, suggerint que aquest grup podria presentar altres tipus d'autoimmunitat⁸⁰.

La successió de fets que es donen en l'AR seronegativa està molt poc caracteritzada però es creu que l'inici també podria derivar d'una interacció de gens i ambient que acabaria donant lloc al desenvolupament d'una cascada immuno-inflamatòria que, en un grup de pacients, estaria conduïda sobretot per vies d'immunitat innata i per citocines. En aquest cas, els gens que conferirien susceptibilitat sembla que estan centrats sobretot en loci que no formen part del HLA. Entre els factors ambientals que hi poden contribuir trobem factors hormonals o de la dieta, entre altres⁸¹.

Fent la comparació entre la forma seropositiva i seronegativa s'ha mostrat que el paper de les cèl·lules T és diferent entre els dos grups. En els pacients ACPA negatius sembla que hi ha més fibrosi i menys infiltració de limfòcits. També sembla que s'observa una tendència cap a una menor presència de centres ectòpics germinals en els teixits sinovials en aquest subgrup^{81,82}. A més, també es va poder establir que els pacients seronegatius presenten nivells menors de citocines pro-inflamatòries derivades de cèl·lules T com la IL-17 que no pas els seropositius, fet que podria tenir relació amb la menor degradació articular observada⁸³.

És important seguir en la cerca de diferents auto-anticòsos que ens puguin ajudar a estratificar o re-classificar els pacients, especialment els seronegatius, per poder entendre millor quin és el procés fisiopatològic que té la malaltia amb l'objectiu de prevenir-la i tractar-la de la manera més eficaç possible. Un dels objectius principals d'aquesta tesi consisteix en l'estudi de nous biomarcadors amb la finalitat de determinar-ne la presència en els pacients d'artritis seronegativa i així millorar les eines de diagnòstic actual i poder comprendre quines vies d'autoimmunitat es poden donar en aquests pacients.

2.3. Casos d'artritis reumatoide especialment greu

2.3.1. Artritis reumatoide amb alt grau de destrucció articular

La severitat de l'AR depèn de la presència de diferents factors que van relacionats amb un pitjor pronòstic. Entre els factors que contribueixen més a que aquesta malaltia sigui classificada com a especialment greu, hi trobem el grau de destrucció articular o progressió radiològica. La destrucció articular progressiva, valorada generalment per tècniques d'imatge, és la causa més important de discapacitat futura i pèrdua de qualitat de vida⁸⁴. Intentar identificar els pacients amb AR que presentaran una forma més greu i amb més tendència a la destrucció articular és una de les prioritats en aquesta malaltia⁸⁵.

Per determinar el grau de destrucció articular i poder classificar els pacients en funció de la severitat de la malaltia que pateixen, existeixen diferents mètodes que es basen en l'anàlisi i puntuació de les lesions analitzades per imatges radiogràfiques de diferents articulacions.

Entre els més habitualment utilitzats trobem el mètode de Larsen^{86,87} i el mètode de Sharp⁸⁸. Tots dos mètodes s'han anat actualitzant al llarg dels anys. Els resultats obtinguts pels dos mètodes que correlacionen bé⁸⁹. El mètode original de Sharp inclou 27 articulacions a cada mà i canell i dona una puntuació a les erosions i el pinçament de l'espai articular que es pateixen i Van der Heijde, en una actualització del mètode de Sharp⁹⁰ també va incloure els peus en les anàlisis radiogràfiques. La suma de totes les puntuacions atorgades a les erosions trobades dona lloc al resultat final que determina el grau d'erosivitat. En el cas del mètode de Larsen es tenen en compte les articulacions de totes les extremitats i el sistema de puntuació també inclou la suma de les erosivitats trobades en cada articulació en comparació a estàndards radiogràfics⁹¹. En tots els casos aquestes determinacions han de ser realitzades per reumatòlegs. En casos d'estudis comparatius de les alteracions de diferents pacients, idealment han d'estar realitzades pel mateix reumatòleg per evitar variacions intra-estudi.

2.3.2. Presència de comorbiditats i manifestacions extra-articulars

Tot i que les principals afectacions de l'AR impliquen les articulacions, es tracta d'una malaltia sistèmica i per tant pot acabar afectant òrgans diversos, de forma més o menys greu⁵.

S'estima que de mitjana cada pacient presenta 2 condicions clíniques que coexisteixen amb el diagnòstic de l'AR^{92,93}. Aquest nombre és menor a l'inici de la malaltia i augmenta amb el pas dels anys⁹⁴. Aproximadament, el 60% dels pacients presenten diverses comorbiditats, és a dir, malalties que concorren de forma simultània a l'AR però que són independents i no tenen causes relacionades. Alguns pacients presenten un altre grup de condicions que són manifestacions de la malaltia principal que es donen fora de l'articulació però que tenen mecanismes patològics comuns i són, en moltes ocasions, causades per la inflamació relacionada amb la malaltia. Reben el nom de manifestacions extra-articulars (ExMs). També es poden donar com a causa de complicacions de la malaltia reumàtica i en compliquen el pronòstic⁹⁵. L'aparició de manifestacions extra-articulars s'ha trobat entre el 18 i el 41% dels pacients d'AR⁹⁵⁻⁹⁷, i entre el 1,5 i el 21,5% presenten ExMs greus⁹⁶.

S'han descrit diferents factors de risc que podrien contribuir a la susceptibilitat a presentar aquestes ExMs (Figura 3). En diferents estudis s'ha parlat de la relació del sexe masculí amb aquesta major tendència⁹⁸⁻¹⁰², però en altres aquesta relació no s'ha pogut establir¹⁰³. També hi ha factors genètics que confereixen més susceptibilitat a patir-les, com alguns dels al·lels de l'epítip compartit, que en general s'han associat amb pitjors resultats i progressions^{104,105}. La presència d'ExMs està també lligada a una més alta mortalitat, com ha estat demostrat en diferents estudis¹⁰⁶⁻¹⁰⁹, i en general a un pitjor pronòstic⁹⁶. En la major part dels pacients de l'estudi, l'excés de mortalitat en el grup de la malaltia extra-articular es va donar després de l'aparició d'aquestes.

La relació de les ExMs amb una major taxa de mortalitat i les complicacions que s'afegeixen com a conseqüència d'elles en el tractament de l'AR fa que siguin un punt important d'estudi i que s'hagin de tenir en compte en les visites mèdiques. És interessant seguir buscant biomarcadors que ens puguin ajudar a desxifrar quines alteracions fora de les articulacions és més probable que es donin, per aturar-ne la progressió i disminuir així els riscos que porten associats.

S'han descrit manifestacions extra-articulars que afecten a òrgans molt diversos del cos humà (Figura 3). Trobem per exemple nòduls reumatoides, manifestacions a nivell pulmonar com la

malaltia pulmonar intersticial o la pleuritis, manifestacions a nivell ocular com l'escleritis o a nivell cardíac com pericarditis o manifestacions a nivell hematològic com anèmia inflamatòria o neutropènia⁵. Aquestes manifestacions extra-articulars tenen diferents nivells de severitat i poden causar alteracions molt diverses en el pacient.

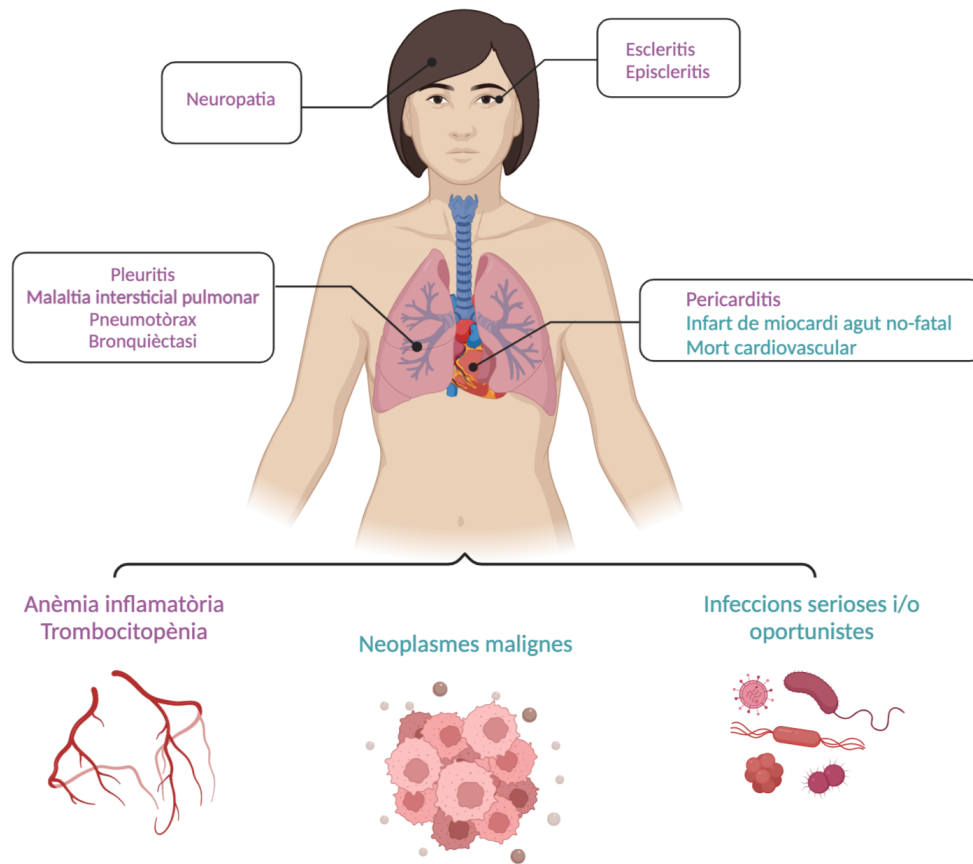


Figura 3: Exemples de manifestacions extra-articulars i de diferents patologies o comorbiditats comuns en el context de l'AR. Es mostren en lila les manifestacions extra-articulars i en turquesa les comorbiditats. Creat en base a els diferents exemples mencionats per Díaz Cuña i col⁵. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com.

Un dels objectius de la tesi és establir la relació de diferents biomarcadors amb la presència de formes severes d'AR. Per dur a terme els estudis englobats en aquesta tesi i que es presentaran en apartats posteriors, hem posat el focus en la malaltia pulmonar intersticial com a manifestació extra-articular donada la seva rellevància i l'alta taxa de mortalitat a la qual s'associa. En el següent apartat s'explicarà més en detall.

2.3.2.1. Malaltia pulmonar intersticial

El pulmó és un dels òrgans que presenten, en general, una major presència de manifestacions extra-articulars en pacients d'AR. L'afectació pulmonar es dona d'una manera més lleu o més greu en un percentatge rellevant de pacients d'AR^{109,110}. Les afectacions pulmonars inclouen diferents graus de fibrosi i inflamació que porten a complicacions en les funcions respiratòries.

Una de les manifestacions més rellevants és la presència del que s'anomena malaltia pulmonar intersticial (ILD, de l'anglès *interstitial lung disease*). Aquest nom fa referència a un grup heterogeni d'afectacions pulmonars que es diagnostiquen en funció de criteris radiogràfics, clínics i fisiopatològics. Estan caracteritzades per la presència d'inflamació i fibrosi que acaba afectant al teixit intersticial i al parènquima pulmonar, on es dona una acumulació de teixit cicatricial que no presenta la funcionalitat d'intercanvi de gasos del teixit original¹¹¹. La conseqüència d'aquestes alteracions és la menor capacitat d'intercanvi d'oxigen, que es trasllada a nivell sistèmic en una menor captació d'aquest i s'associa a la dificultat de respirar i la dispnea. Es tracta de la manifestació més comuna i també la més perillosa¹¹².

La presència d'ILD en pacients d'AR en fa incrementar de forma considerable la mortalitat associada, en comparació a la presentada en els pacients d'AR sense ILD^{101,110,113,114}. En un estudi recent, s'ha pogut determinar que el ratio de mortalitat en els pacients d'AR-ILD vs AR és de 2,86:1. En el mateix estudi, es va poder determinar també que l'esperança de vida mediana és inferior en pacients d'AR-ILD que en pacients que presenten AR sense la manifestació extra-articular (2,6 anys vs 9,9)^{101,115}. L'excés de mortalitat atribuïble a la presència de la manifestació extra-articular es dona principalment com a conseqüència de la progressió de la malaltia pulmonar que dona lloc a la insuficiència respiratòria¹¹⁶.

Les diferències en els mètodes i tècniques de diagnòstic emprades fan que els valors d'incidència i prevalença reportats siguin heterogenis¹¹⁷. Diferents resultats mostren taxes de prevalença i incidència entre el 1 i el 58%^{110,118,119}. El no reconeixement de la presència d'ILD subclínica també dificulta el correcte càlcul de la prevalença i incidència, ja que s'estima que aquesta es dona en un nombre elevat de casos i que, en aproximadament el 50%, aquesta acaba avançant fins a acabar donant problemes respiratoris a conseqüència de les alteracions pulmonars, podent esdevenir així simptomàtica¹¹⁰.

Pel que fa als factors de risc, també s'ha trobat una associació entre el tabaquisme i el risc de patir ILD i en la gravetat amb la que es manifesta¹¹². L'ILD és també més freqüent en homes^{117,120}. La relació entre els alts nivells de FR i ACPAs i un augment del risc de desenvolupar AR-ILD està sota estudi. Diferents estudis confirmen aquesta associació¹²¹⁻¹²³, però aquesta troballa no ha estat replicada en estudis posteriors¹²⁴. Aquestes discrepàncies podrien ser conseqüència de les diferències dels paràmetres de diagnòstic o en els mètodes de detecció dels anticossos.

Altres anticossos que són objecte d'estudi, com els anti-CarP, han estat associats a la presència d'AR-ILD recentment en un estudi del nostre grup de recerca¹²⁵. Aquest descobriment té una especial rellevància ja que descriu una associació nova entre un tipus d'autoanticossos diferents als ACPAs i una manifestació extra-articular especialment greu i dóna peu a l'estudi tant de la relació dels anti-CarP amb la fisiopatologia de la malaltia com a la hipòtesi que altres auto-anticossos, com els AAPA, també podrien tenir alguna relació amb aquest tipus de manifestacions extra-articulars. L'estudi de diferents auto-anticossos en relació a la detecció de biomarcadors pel diagnòstic de l'AR-ILD com a forma greu d'AR donen lloc a un dels apartats d'aquesta tesi.

3. AUTOANTICOSSOS EN L'AR

La presència d'autoanticossos és un dels segells característics de l'AR i han ajudat a caracteritzar-la i diagnosticar-la de forma més eficient. Els dos tipus d'autoanticossos més estudiats en el context de l'AR són el factor reumatoide i els ACPAs. Els dos estan inclosos com a biomarcadors en els criteris actualment vigents (ACR/EULAR 2010) pel diagnòstic de la malaltia¹²⁶. Més recentment, s'han descrit altres tipus d'autoanticossos dirigits a diferents modificacions post-traduccionals que també podrien tenir una rellevància en la fisiopatologia de la malaltia i podrien contribuir, com a nous biomarcadors, a millorar les eines de diagnòstic actuals i a estratificar de forma més acurada als pacients. Suposen també una esperança de cara al diagnòstic serològic del subgrup fins ara considerat d'AR seronegativa, on els ACPAs no semblen estar presents però no es descarta la presència d'altres tipus d'autoanticossos. A continuació, s'explicarà amb més detall les diferents famílies d'autoanticossos amb rellevància en l'AR.

3.1. Factor reumatoide

El factor reumatoide és un tipus d'autoanticòs dirigit a la fracció constant (Fc) de la immunoglobulina G. La descripció d'un anticòs dirigit a les immunoglobulines i que induïa l'aglutinació dels eritròcits es va descriure a la primera meitat del segle XIX, però no va ser fins al 1952, que es va establir la seva associació amb l'AR¹²⁷⁻¹²⁹. Tot i ser localitzats en sèrums de pacients d'AR, aquest tipus d'anticòs no és exclusiu de la malaltia, i es troba tant en altres malalties reumàtiques (lupus eritematòs sistèmic o síndrome de Sjögren primària) com en infeccions cròniques (infecció pel virus de l'hepatitis C, bronquiectàsies)¹²⁹. Fins i tot, es pot detectar en un percentatge d'individus sans, especialment d'edat avançada, tot i que en aquests casos són diferents ja que es presenten nivells baixos de factor reumatoide de baixa afinitat¹³⁰.

Independentment de la seva presència en altres contextos, el FR és útil en el diagnòstic de l'AR i el seu ús com a marcador permet discriminar els pacients amb una sensibilitat que va del 60 al 80% amb una especificitat del 85%^{131,132}. Per millorar aquesta especificitat, en moltes ocasions en la pràctica clínica, i seguint els criteris diagnòstics establerts l'any 2010¹²⁶, es combina amb la detecció d'ACPs. La utilització simultània dels dos marcadors permet un augment de l'especificitat del test degut a que la resposta ACPA es més específica, alhora que es manté un nivell de sensibilitat acceptable ja que els dos anticossos es complementen^{133,134}. Nivells alts d'aquest marcador correlacionen amb formes més greus d'AR¹²⁹.

L'isotip de factor reumatoide més prevalent és l'IgM. Diferents estudis han suggerit que un increment combinat de FR dels isotips IgM i IgA es dona de forma gairebé exclusiva en el context de l'AR tot i que altres combinacions que inclouen l'anticòs FR també tindrien un alt valor predictiu. S'ha descrit en un estudi que la presència de FR-IgA era un bon predictor del desenvolupament d'AR, comparable als resultats obtinguts amb el test comercial emprat per detectar la resposta ACPA a pèptids cíclics citrul·linats (anti-CCP de l'anglès *anti-cyclic citrullinated peptides*) i que la combinació dels dos biomarcadors presentava una sensibilitat del 60% amb una especificitat del 99% en la discriminació de pacients d'AR precoç^{134,135}.

3.2. Autoanticossos contra pèptids/proteïnes modificades

Les PTMs són canvis o modificacions covalents que es donen en aminoàcids específics de les diferents proteïnes i poden ser deguts a l'acció d'enzims o bé donar-se de forma espontània. Presenten un paper clau en les proteïnes ja que influeixen en les seves característiques bioquímiques i per tant en el seu plegament, en les interaccions amb els lligands i/o amb altres proteïnes i també, tal i com es fa patent en el cas de l'AR, en el seu possible paper immunogènic. Les PTMs presents en proteïnes natives en l'ésser humà poden causar, en contextos principalment d'inflamació, que aquestes siguin reconegudes com auto-antígens, processades i presentades a cèl·lules T auto-reactives¹³⁶.

Tot i que la citrul·linació segueix sent el tipus de modificació post-traducciona més ben caracteritzada i estudiada en l'AR, recentment s'han descrit múltiples autoanticossos contra altres tipus de modificacions post-traduccionals. Aquest tipus d'autoanticossos rep com a nom global el d'anticossos contra proteïnes/pèptids modificats post-traduccionals (AMPAs).

3.2.1. Autoanticossos contra proteïnes/pèptids citrul·linats

El descobriment per part de Schellekens et al.¹³⁷ que la citrul·lina era el principal constituent detectat pels anticossos en sèrums de pacients d'AR i que permetien discriminar-los de persones sense aquesta patologia de forma específica va ser una peça clau en el desenvolupament de diferents tests diagnòstics i hipòtesi sobre la fisiopatologia de l'AR. A més, aquest tipus d'autoanticossos estan presents en etapes molt inicials, fent-los encara més interessants com a biomarcadors³.

Els anticossos contra proteïnes/pèptids citrul·linats detecten l'aminoàcid citrul·lina dins la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes o pèptids. La citrul·lina és una modificació post-traducciona conseqüència de l'acció dels enzims de la família de les PAD, especialment les isoformes 2 i 4 (PADI2 i PADI4, de l'anglès *peptidil arginine deiminase isoform-2* i *peptidil arginine deiminase isoform-4*), i que de forma dependent de calci poden convertir les arginines en citrul·lines (Figura 4). Aquesta deiminació té conseqüències a nivell de l'estructura de la proteïna ja que mentre que l'arginina presenta una carrega positiva a pH neutre, la citrul·lina no presenta càrrega. Aquest canvi d'estructura també implica un canvi en les seves funcions i provoca la seva implicació en diferents patologies com l'AR, objecte del nostre estudi, però també en esclerosi múltiple o Alzheimer¹³⁸.

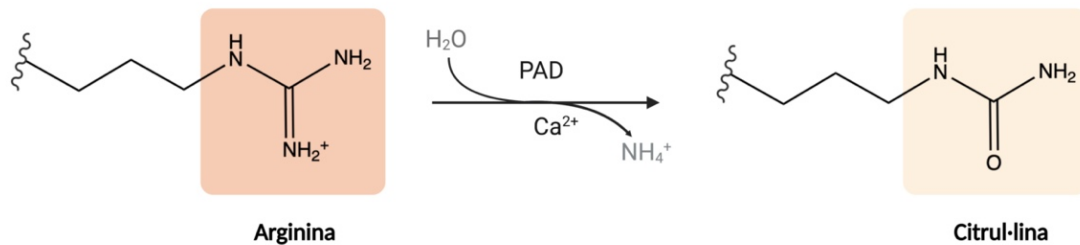


Figura 4: Esquema del procés de citrul·linació. Conversió dels residus d'arginina a residus de citrul·lina degut a l'acció de la proteïna arginina deiminasa en un context ric en calci. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

Els ACPA formen part d'un grup heterogeni d'anticossos entre els quals n'hi ha de baixa afinitat i que es troben també presents en baixa proporció en pacients sans i d'alta afinitat, que són el tipus d'autoanticòs específic en pacients d'AR. Els ACPA d'alta afinitat són els que han anat madurant en els processos que es donen en els anys previs a la presentació clínica de l'AR i que podrien tenir un paper patogènic¹³⁹.

Els ACPAs reconeixen múltiples epítops derivats de diferents proteïnes i pèptids i cadascun dels epítops citrul·linats que reconeixen s'anomenen especificitats fines. Es desconeix quin és el nombre total de proteïnes que podrien actuar com autoantígens després de la seva citrul·linació, però destaquen algunes com la filagrina¹⁴⁰, el fibrinogen¹⁴¹⁻¹⁴³, la vimentina¹⁴⁴, el col·lagen de tipus II¹⁴⁵ o l'enolasa¹⁴⁶, que han estat identificades en teixit sinovial de pacients i emprades amb èxit en la detecció d'anticossos d'aquesta família. L'expansió dels epítops reconeguts pels ACPA es dona en les fases preclíniques de l'artritis, quan ja són detectables en el sèrum dels pacients, i sembla que un cop la malaltia es manifesta, aquesta expansió ja s'ha estabilitzat i no progressa més.

De la mateixa manera, també s'estabilitzen els nivells detectables d'aquests autoanticossos⁶⁰. Es considera que una part dels ACPA tenen una resposta més "promiscua" i que presenten reactivitat creuada per diferents antigens mentre que una altra part dels ACPA tenen una resposta "privada" i que es més selectiva en relació als antigens reconeguts. Aquests diferents tipus d'ACPAs podrien tenir funcions o rols diferents en la malaltia¹⁴⁷.

En termes generals, els ACPAs estan presents en aproximadament el 70% dels pacients d'AR i es poden detectar mitjançant tests comercials que presenten una especificitat al voltant del 95%, en funció de quina versió comercial es faci servir¹⁴⁸. S'entrarà en més detall sobre aquest tipus de test en apartats posteriors.

3.2.2. Autoanticossos contra proteïnes/pèptids carbamils

El segon grup més conegut d'autoanticossos en l'AR són els anticossos contra proteïnes/pèptids carbamils (anti-CarP). La diana específica d'aquests anticossos és la modificació post-traducciona anomenada carbamilació o homocitrul·linació, i per tant detecten l'aminoàcid no essencial anomenat homocitrul·lina⁸⁰.

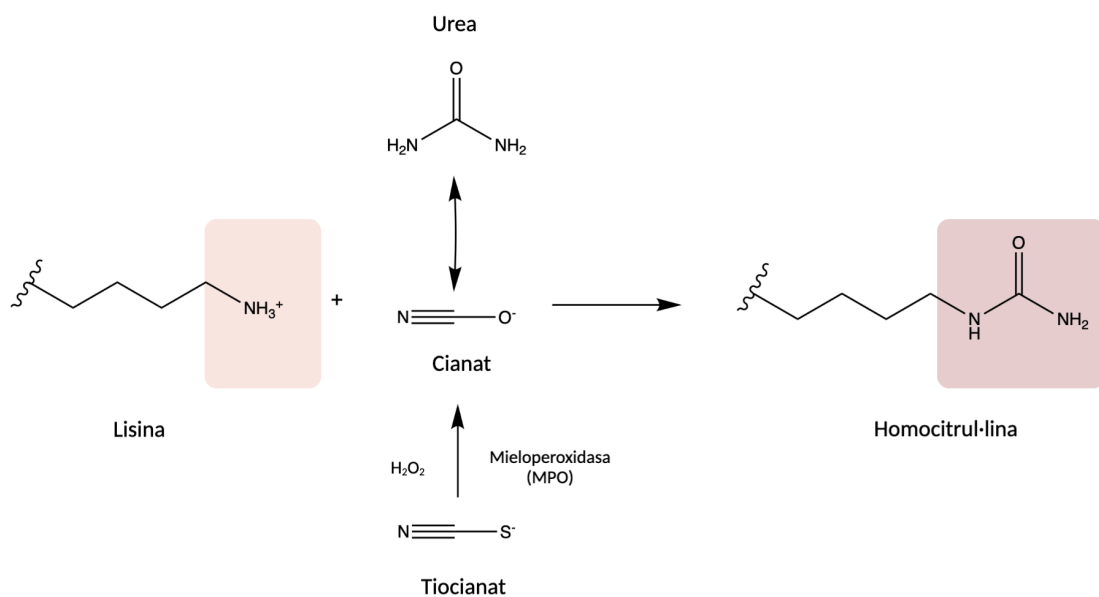


Figura 5: Esquema del procés de carbamilació. Conversió dels residus de lisina a residus de homocitrul·lina en presència de cianat. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

La carbamilació (Figura 5), que és el procés de conversió dels residus de lisina mitjançant una reacció química en presència de cianat, no es dona de forma exclusiva en l'AR. En condicions fisiològiques, els nivells de cianat són baixos i no són suficients per induir una carbamilació extensiva de les proteïnes. Quan hi ha alteracions dels paràmetres fisiològics, hi ha un desequilibri

d'aquest compost que permet que la reacció es doni¹⁴⁹. Això succeeix en contextos on hi ha nivells alts d'urea, com les malalties renals, ja que aquesta pot ser convertida en cianat.

Aquestes mateixes condicions es donen com a conseqüència del tabac o de la presència d'inflamació. En el segon cas, a més, es dona un augment del nivell de l'alliberació de mieloperoxidasa emmagatzemada en neutròfils que també contribueix a l'augment del cianat ja que promou la reacció de conversió de tiocianat a cianat^{1,60,150}.

Aquest tipus de modificació, a diferència de la citrul·linació, es dona en els residus de lisina presents en diferents proteïnes del teixit sinovial. L'aminoàcid homocitrul·lina presenta una estructura molt semblant a la de la citrul·lina. De fet, l'única diferència és la presència d'un grup metilè extra en la seva cadena. És per aquesta similitud que s'especula que existeix una certa reactivitat creuada entre els anticossos anti-CarP i els ACPA, com s'ha vist en diferents estudis^{151,152}.

Els anti-CarP també estan presents entre el 10 i el 20% dels pacients d'AR seronegatiu, troballa que confirma la seva independència dels ACPA com a subgrup d'autoanticossos^{80,153}. La presència d'anti-CarP també s'associa a una major destrucció articular i pitjor pronòstic en l'AR, també en el subgrup d'AR seronegativa¹⁵⁴. La triple positivitat anti-CarP, ACPA i FR es troba de forma gairebé exclusiva en pacients d'AR, de manera que la concordança dels 3 autoanticossos tindria implicacions diagnòstiques per la seva altíssima especificitat¹⁵⁵.

La detecció d'aquest tipus d'autoanticossos en el context de l'AR va ser descrita per primera vegada per Shi et al⁸⁰ en un assaig en el que s'utilitza com antígen el sèrum fetal boví (FCS, de l'anglès *fetal calf serum*) en la seva forma carbamilada. El FCS és una barreja rica en proteïnes diferents que quan es tracta per induir la carbamilació pot donar lloc a molts antígens, amplificant així el ventall d'epítops presentats amb l'objectiu de millorar la sensibilitat de l'assaig. Posteriorment, com a part d'aquest assaig, també es va dur a terme la detecció d'anti-CarP mitjançant la carbamilació del fibrinogen per confirmar que els anti-CarP reconeixen autoantígens i no només proteïnes no humanes¹⁵⁴. Aquest tipus d'assaig ha estat reproduït en cohorts diferents a l'original donant lloc a resultats similars en termes de sensibilitat i especificitat^{150,156} i és també un dels assaigs que s'ha emprat en la detecció d'anti-CarP com a part d'aquesta tesi.

3.2.3. Autoanticossos contra proteïnes/pèptids acetilats

La tercera família d'autoanticossos descrita en l'AR és la formada pels anticossos contra proteïnes/pèptids acetilats, els AAPAs. Aquests auto-anticossos tenen novament com a objectiu una modificació que es dona en els residus de lisina. En aquest cas la modificació consisteix en l'addició d'un grup acetil als residus de lisina per part d'uns enzims anomenats histones acetiltransferases (HATs) en un procés anomenat acetilació, reversible per l'acció de les histones desacetilases (HDATs). El producte resultant d'aquesta modificació és l'acetil lisina, que té un grau alt de similitud amb la homocitrul·lina (presentada en l'apartat anterior). En aquest cas, el grup amino de la cadena lateral és substituït per un grup acetil. L'acetilació de proteïnes (Figura 6) és es dona tant en humans com en microorganismes^{154,157} i és important en la regulació cel·lular d'histones i de factors de transcripció. També està implicat en la regulació de funcions enzimàtiques i vies metabòliques en el citoplasma⁶⁰.

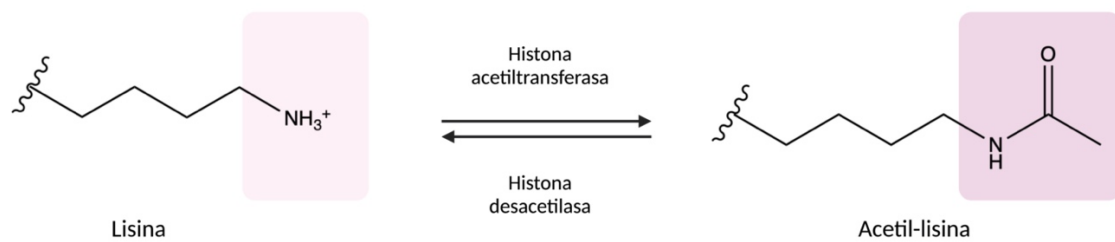


Figura 6: Esquema del procés d'acetilació. Conversió dels residus de lisina a residus d'acetil lisina per l'acció enzimàtica de les histones acetiltransferases. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

La identificació per primera vegada d'aquest tipus d'autoanticossos en sèrums de pacients la van dur a terme Juárez et al¹⁵⁸. Per confirmar la presència d'aquest tipus d'autoanticossos en sèrums de pacient d'AR, van utilitzar com a antigen un pèptid de 12 aminoàcids derivat de la isoforma de vimentina mutada que forma part del test comercial anti-MCV (de l'anglès *mutated citrullinated vimentin*). En la seqüència original del pèptid no hi ha cap lisina i la PTM va ser introduïda en la posició 7, en la part central de la seqüència, on originalment hi havia un residu d'arginina.

Els resultats obtinguts van estimar la presència d'aquest tipus d'autoanticossos en aproximadament el 40% dels pacients d'AR. Es va donar un cert nivell de positivitat en pacients anti-CarP i ACPA negatius, confirmant la presència d'aquesta nova família d'autoanticossos, però els nivells de detecció en pacients seronegatius eren limitats. Estudis posteriors duts a terme amb el pèptid de 12 aminoàcids ja mencionat incloent noves modificacions en la posició 2 i 7 de la

seqüència van confirmar que existeix reactivitat creuada però també es va poder confirmar la reactivitat exclusiva en front a antígens modificats amb acetil lisines^{159,160}.

La rellevància d'aquest tipus d'autoanticossos en el context de l'AR i la seva contribució a la detecció i diagnòstic de la presència de formes més severes d'artritis serà estudiada com a part d'aquesta tesi.

3.2.4. Autoanticossos contra proteïnes/pèptids amb adductes de MAA

Una de les últimes famílies d'autoanticossos descrites en sèrums de pacients d'AR és la formada pels anticossos contra proteïnes modificades amb adductes de malondialdehid (MDA) i acetaldehid (AA), també anomenats anti-MAA. Aquestes modificacions, de la mateixa manera que passa en la homocitrul·linació i l'acetilació, es donen en residus de lisina presents en les proteïnes natives.

En aquest cas, la modificació dels residus de lisina es dona com a conseqüència de l'estrès oxidatiu present a causa dels processos inflamatoris. L'activació persistent del sistema immunitari i la inflamació promouen l'alliberació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que tenen una alta capacitat reactiva i que indueixen la peroxidació de les membranes lipídiques. Com a conseqüència de peroxidació de les membranes s'alliberen més molècules reactives com el MDA, que alhora espontàniament pot donar lloc a AA¹⁶¹. Aquests dos compostos reaccionen amb els residus de lisina i donen lloc a la formació d'adductes amb diferents característiques¹⁶². S'han trobat diferents proteïnes modificades per aquests compostos, entre les que s'inclouen la vimentina, el fibrinogen, l' α -enolasa o l'albumina¹⁶³.

Com a conseqüència de l'exposició a malondialdehid i acetaldehid de forma simultània es poden formar predominantment dues estructures diferents (Figura 7). La primera estructura és la del compost 2-formil-3(alquilamino)butanal, que també rep el nom d'adducte FAAB. Es tracta d'una estructura inestable i que s'obté com a conseqüència de la reacció amb acetaldehid, malondialdehid i lisina a concentracions equimolars. No presenta propietats fluorescents.

El segon compost es denomina 4-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldehid o adducte MDHDC i és el resultat de la reacció de les lisines amb una relació equimolar 2:1 de malondialdehid:acetaldehid. És el compost que es genera de forma majoritària. La formació d'un anell piridina li confereix estabilitat i li atorga propietats fluorescents que el caracteritzen i

permeten distingir-lo mitjançant anàlisis de fluorescència. Aquest segon compost és el residu de lisina-MAA que es pretén emprar com antigen per la detecció dels anticossos anti-MAA¹⁶³⁻¹⁶⁵.

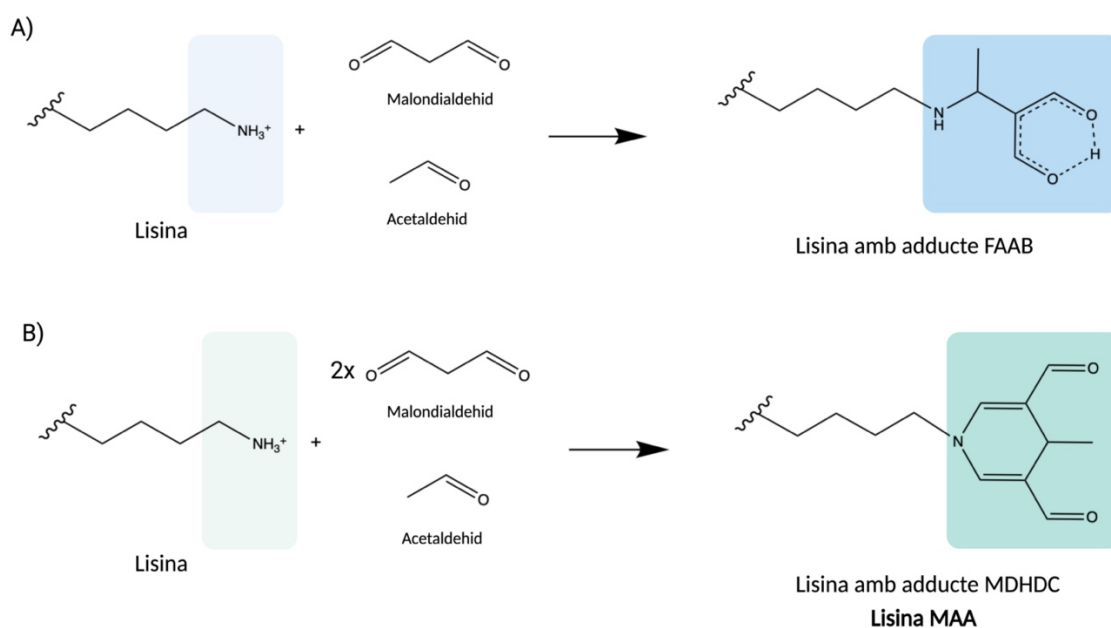


Figura 7: Esquema del procés de formació d'adductes de MAA en els residus de lisina. A) Formació dels adductes FAAB en la cadena lateral de la lisina com a conseqüència de la reacció dels residus de lisina amb una relació equimolar de MDA:AA. Com a resultat s'obté un compost sense propietats fluorescents i amb una estructura inestable. B) Formació dels adductes MDHDC en la cadena lateral de la lisina com a conseqüència de la reacció dels residus de lisina amb una relació 2:1 de MDA:AA. Formació d'una estructura estable i amb propietats fluorescents. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

El desenvolupament d'un test per part de Thiele et al emprant albúmina humana tractada per presentar adductes de MAA va permetre l'anàlisi i detecció d'anti-MAA en una cohort de pacients d'AR formada per veterans de guerra, predominantment homes, de diferents centres d'Estats Units inclosos en un registre comú anomenat VARA (*Veterans Affairs Rheumatoid Arthritis*). Sorprenentment aquest tipus d'autoanticossos es va detectar en aproximadament el 90% de casos d'AR per l'isotip IgG, mentre que la detecció va ser menor, tot i que també alta, per IgA i IgM^{154,161}. La presència d'aquest tipus d'autoanticòs correlacionava bé amb la presència d'ACPAs però també es va poder detectar una alta reactivitat anti-MAA entre els pacients ACPA negatius^{161,166}. Les concentracions d'anticossos anti-MAA van ser significativament més altes tant en pacients d'AR seropositiva com seronegativa i nivells més alts d'aquests autoanticossos van correlacionar bé amb la presència de manifestacions extra-articulars i la presència de malaltia més greu. Recentment també s'ha relacionat la presència d'aquest marcador amb la manifestació d'ILD associada a l'AR, que com ja s'ha explicat anteriorment, implica la presència d'un curs més sever de la malaltia¹⁶⁷.

Per poder confirmar la sensibilitat d'aquest marcador en el context de l'AR, es va dur a terme un nou assaig en el que es van incloure tant pacients d'AR com d'altres patologies similars caracteritzades per la presència d'artritis inflamatòria. Els resultats van avalar l'alta sensibilitat observada, confirmant la presència de nivells més alts d'anti-MAA en els pacients d'AR que en les altres patologies, tant en pacients seropositius com seronegatius¹⁶⁸. La detecció d'aquesta família d'autoanticossos en pacients seronegatius descrita per Thiele et al¹⁶¹ és esperançadora ja que obre la possibilitat a la seva utilització com a biomarcadors serològics que permetin un millor diagnòstic i estratificació d'aquest grup de fins ara difícil classificació.

Tot i així, en aquest últim estudi també es va confirmar la presència d'anti-MAA en altres malalties reumatològiques¹⁶⁸, qüestionant-ne l'especificitat com a marcador de l'AR. A més, també ha estat detectat en patologies diverses com malalties cardiovasculars^{169,170}, dany hepàtic^{162,171} o colitis ulcerosa¹⁷².

Com a part del treball inclòs en aquesta tesi es realitzarà l'estudi de la detecció d'anti-MAA amb l'objectiu de poder determinar la sensibilitat d'aquest tipus de biomarcador en una cohort independent de pacients i controls, i també determinar el seu valor pronòstic en relació a la presència de formes més severes de l'AR.

4. DIAGNÒSTIC DE L'AR

El diagnòstic de l'AR és fonamentalment clínic. El diagnòstic és complex degut a l'alta heterogeneïtat que presenta la malaltia i per tant no està basat en un sol paràmetre sinó que es du a terme mitjançant un seguit de criteris classificatoris que tenen en compte diferents factors. L'AR, com s'ha explicat, presenta una evolució crònica, en l'inici de la qual la simptomatologia clínica pot no ser evident. Fer el diagnòstic en els moments inicials per poder iniciar el tractament abans de que es presenti destrucció articular és clau per evitar danys permanents i incapacitants en els pacients. En comparació amb els criteris que es fan servir a nivell clínic per classificar els pacients i que presenten una gran especificitat, els criteris per establir un diagnòstic i que estan orientats a determinar la presència d'una malaltia en les etapes inicials, han de presentar una alta sensibilitat.

4.1. Característiques de les proves diagnòstiques

La sensibilitat d'un test fa referència a la capacitat d'una prova de detectar a un malalt correctament en una prova – és a dir, que estigui malalt i el resultat de la prova sigui positiu. L'especificitat, en canvi, fa referència a la capacitat d'identificar a un individu sa correctament en la prova – és a dir, que l'individu sa presenti una prova negativa. Són conceptes que serveixen per determinar la capacitat diagnòstica intrínseca d'una prova. Una mateixa prova pot presentar diferents valors de sensibilitat i especificitat segons les condicions de l'assaig. Les proves es poden fer servir en poblacions amb diferent prevalença de malaltia i aquests valors no canvien ¹⁷³.

Altres conceptes que s'han de tenir en compte en els tests diagnòstics són els valors predictius, és a dir, la probabilitat que els pacients tinguin la malaltia un cop es coneix el resultat de la prova. El valor predictiu positiu (VPP) fa referència a la probabilitat que un individu amb un test positiu tingui la malaltia i es correspon al total de malalts amb proves positives d'entre el total de proves positives. En el cas del valor predictiu negatiu (VPN) es fa referència a la probabilitat que un individu amb una prova negativa no tingui la malaltia i per tant es correspon al total de persones sanes amb prova negativa d'entre totes les proves negatives obtingudes ¹⁷³.

4.2. Criteris diagnòstics en l'AR

Els criteris que històricament han ajudat als reumatòlegs a establir un diagnòstic clínic i que s'han fet servir per determinar la presència d'AR daten de l'any 1987 (Taula 1) ¹⁷⁴. Estan desenvolupats en funció de les observacions fetes en la recerca clínica o en estudis epidemiològics i són criteris classificatoris més que diagnòstics, ja que estaven pensats per distingir els pacients d'AR establerta d'altres artropaties inflamatòries. En aquest grup de població, d'AR establerta, els valors de sensibilitat i especificitat obtinguts dels diagnòstic amb aquests criteris eren suficientment alts (entre 79-80% de sensibilitat i 90-93% d'especificitat respectivament); en canvi, en pacients d'AR de curta evolució, la sensibilitat i especificitat són més baixes ^{175,176}.

Criteri	Definició
Rigidesa matutina	Rigidesa al matí en les articulacions o al voltant durant almenys 1 hora
Artritis present en ≥ 3 articulacions	Inflamació del teixit o presència de fluid en com a mínim 3 articulacions de les següents: interfalàngiques de la mà, metacarpofalàngiques, metatarsofalàngiques, canell, colze, genoll o turmells
Artritis en les articulacions de les mans	Inflamació de les articulacions del canell, metacarpofalàngiques o interfalàngiques de la mà
Artritis simètrica	Afectació simultània de les àrees descrites en l'apartat anterior en els dos costats del cos. Com a mínim ha de passar en el 50% de les àrees afectades
Nòduls reumàtics	Presència de nòduls reumàtics subcutanis
Factor reumatoide	Detecció del factor reumatoide amb un mètode amb una especificitat mínima del 95%
Canvis radiogràfics	Erosions o descalcificacions localitzades en les articulacions de les mans o dels canells
S'estableix un diagnòstic d'AR si com a mínim es donen 4 d'aquests criteris. Els criteris 1-4 han de donar-se durant un mínim de 6 setmanes.	

Taula 1: Criteris classificatoris d'AR establerts al 1987 pel Col·legi Americà de Reumatologia ¹⁷⁴.

Diversos dels criteris aquí inclosos (com els canvis radiogràfics o l'aparició de nòduls reumatoides) normalment no es donen en el primer any de malaltia sinó en els anys posteriors, de tal manera que el diagnòstic en pacients d'AR d'inici recent seria molt difícil d'establir. L'ús de pacients d'AR establerta per determinar els criteris aquí establerts dificulten el diagnòstic de pacients d'altres estadis de la malaltia, especialment les fases inicials, degut a les diferències clíniques que presenten ^{126,177}.

Els avenços en l'estudi de l'AR i el descobriment de diferents biomarcadors a part del factor reumatoide, ja inclòs en els criteris de 1987, van impulsar la modificació i actualització dels criteris d'AR d'acord amb el 2010 per part del Col·legi Americà de Reumatologia (ACR) i la Lliga Europea d'Associacions de Reumatologia (EULAR). Es van establir unes noves guies per ajudar al reumatòleg en el correcte diagnòstic ¹⁷⁸.

Una de les principals mancances dels criteris anteriors i per tant objectius d'aquesta nova eina és el diagnòstic de casos d'AR d'inici que es trobin encara en la finestra d'oportunitat necessària per aplicar tractaments que frenin la progressió de la malaltia. Els criteris de detecció inclosos en la nova guia de classificació de 2010 (Taula 2) estan pensats per ser aplicats en pacients que presenten inflamació articular quan se'ls hi fa una exploració clínica i pels quals no hi ha cap altra malaltia que pugui explicar la sinovitis ¹⁷⁹. És a dir, estan pensats per poder detectar la malaltia en les primeres fases¹⁸⁰.

Criteris de classificació ACR/EULAR 2010		Valor
A) Alteracions articulars (inflamada/tendre)		
1 articulació gran		0
2-10 articulacions grans		1
1-3 articulacions petites (amb o sense afectació d'articulacions grans)		2
4-10 articulacions petites (amb o sense afectació d'articulacions grans)		3
>10 articulacions (com a mínim afectació d'1 articulació petita)		5
B) Serologia		
FR/ACPA negatiu		0
Positiu baix FR/Positiu baix ACPA		2
Positiu alt FR/Positiu alt ACPA		3
C) Reactius de fase aguda		
Valors normals de PCR i VSG		0
Valors anormals de PCR i VSG		1
D) Durada dels símptomes		
<6 setmanes		0
≥6 setmanes		1
Sumatori de les categories de l'A fins la D. Una puntuació ≥6/10 és necessària per classificar els pacients amb AR.		

Taula 2: Criteris establerts al 2010 per part d'ACR/EULAR pel diagnòstic de l'AR. FR (Factor Reumatoide), ACPA (Anticòs contra proteïnes/pèptids citrul·linats), PCR (Proteïna C Reactiva), VSG (Velocitat de Sedimentació Globular).

Els nous criteris inclosos són principalment biomarcadors serològics detectables al laboratori en etapes inicials de l'AR com els ACPAs o marcadors inespecífics d'inflamació aguda com la proteïna C reactiva o la velocitat de sedimentació globular (VSG). A part es conserva la detecció del FR ja inclòs en el criteri anterior. Es té en compte la combinació dels dos marcadors que són característics de l'AR. En canvi, alguns criteris com la inclusió dels nòduls reumatoides i la simetria de l'afectació articular sembla que no contribuïen a millorar el valor predictiu positiu de la prova i han estat exclosos dels nous criteris.

Es va treballar en la creació d'un sistema de puntuació que permetés classificar pacients amb artritis inflamatòria en els primers moments de la malaltia i predir si eren candidats a presentar malaltia erosiva i persistent, per així ser considerats pel tractament. S'ha pogut determinar que aquests nous criteris serveixen per classificar els pacients d'acord a l'absència o presència d'AR però no són prou precisos com per estratificar-los en altres subgrups ^{150,181}. En les condicions on es presenten alteracions radiogràfiques compatibles amb l'AR, no es considera necessari complir cap altre criteri per tenir un diagnòstic clar d'AR.

Diferents revisions dels resultats obtinguts amb aquests criteris, suggereixen millores que es poden aplicar per millorar-ne el seu ús. Per exemple, donat que el VPP dels ACPAs és fins a 3 vegades millor que del FR, es proposa que es doni més pes a aquest tipus d'autoanticossos com a criteri diagnòstic ¹⁷⁹.

Un altre factor que cal tenir en compte és el fet que aquestes nous criteris, com ja hem dit, posen molt de pes en els biomarcadors serològics, de tal manera que ajuden a classificar des de l'inici pacients amb AR seropositiva. En canvi, els pacients d'AR seronegativa, han de complir criteris d'inflamació més estesa i forta per poder sumar una puntuació que els situï per sobre del punt de tall de puntuació establert. S'ha pogut comprovar que els pacients d'AR seronegativa presenten nivells més alts d'inflamació i destrucció articular en el moment del diagnòstic que els pacients d'AR seropositiva ¹⁸². Tot i que aquests criteris, com hem esmentat, tenen l'objectiu de classificar i de servir d'ajuda al reumatòleg, aquestes diferències entre els dos subgrups d'AR poden generar diferències en el tractament immediat i la progressió de la malaltia ¹⁸¹.

En aquest context, sembla imprescindible trobar eines que ens permetin classificar de forma eficaç els casos d'AR seronegativa, que arriben fins al 30% de la població d'AR. A part dels biomarcadors "estàndards" i establerts ja en la classificació de l'AR, i com s'ha explicat en apartats anteriors, s'han descrit altres sistemes d'autoanticossos que podrien ajudar a classificar i estratificar els pacients.

Els anticossos contra proteïnes carbamilades s'han trobat en fins a un 45% de pacients d'AR. En aproximadament un 25% dels casos, els pacients anti-CarP (+) també presenten ACPAs, però aquests autoanticossos s'han trobat en el 15-20% dels pacients d'AR de forma independent dels ACPAs⁸⁰. Si bé és cert que els anti-CarP per si sols, en alguns estudis preliminars sembla que no aporten molt valor discriminatiu dins del subgrup FR/ACPA (-)¹⁴⁰, sí que s'ha observat que pacients que presenten aquest tipus d'autoanticossos presenten un pronòstic i fenotip clínic diferents dels pacients doble negatius pels altres marcadors i per tant és important seguir treballant i analitzant les implicacions d'aquests auto-anticossos¹⁸².

Per altra banda, recentment s'han descrit nous tipus d'autoanticossos en el context de l'AR com són els que tenen com a objectiu les acetil lisines (AAPA). El descobriment d'aquest nou tipus d'anticòs ha de ser objecte d'estudi per tal de determinar si poden aportar un valor diagnòstic en el context de l'artritis, especialment en la seva possible presència en els pacients seronegatius. També caldrà veure el grau de concordança que presenta aquest tipus d'autoanticòs amb els altres ja mencionats (ACPA, FR i anti-CarP). De la mateixa manera, els anticossos contra proteïnes o pèptids amb adductes de malondialdehid-acetaldehid han de ser igualment estudiats per poder establir la seva capacitat discriminatòria, que tenint en compte els resultats fins ara publicada, és esperançadora.

4.3. Determinació dels ACPAs

En la pràctica clínica és necessària una eina estandarditzada per tal de poder fer les determinacions dels anticossos inclosos en els criteris de classificació d'una manera uniforme en les diferents poblacions i tenir resultats comparables que permetin fer un diagnòstic o aportar la informació necessària per als metges de forma acurada. En el cas dels autoanticossos contra proteïnes/pèptids citrul·linats es va desenvolupar una prova de tipus ELISA (de l'anglès *enzyme-linked immunosorbent assay*) que permet detectar la presència d'aquests anticossos en els sèrums dels pacients d'una forma senzilla i en un període de temps curt. La base d'aquest immunoassaig s'explicarà en els posteriors apartats.

5. REUMATISME PALINDRÒMIC

5.1. Què és?

El reumatisme palindròmic (RP) és un tipus d'artropatia inflamatòria de caràcter intermitent que es caracteritza per crisis agudes de dolor i tumefacció articular (i a voltes periarticular) que es va repetint al llarg del temps, però sense deixar dany residual^{183,184}. En cada brot es sol afectar només una articulació, i és molt característic que siguin de curta durada (d'1 a 3 dies) amb resolució espontània de la crisi. El curs clínic és variable pel que fa a la freqüència dels brots i les articulacions afectades tot i que predominen en les articulacions de les mans^{184,185}.

Hi ha pocs estudis pel que fa a la epidemiologia del RP, però s'ha establert que la freqüència és significativament més baixa que la de l'AR, amb una ratio suggerida de 1 pacient de RP per cada 20 d'AR diagnosticats. Aquest síndrome reumatològic sembla que afecta també als dos sexes però en predomina una afectació femenina i amb una edat de diagnòstic d'entre els 40-45 anys¹⁸⁵. L'interès d'aquesta entitat radica en que després de la fase intermitent, que pot durar mesos o anys, un nombre significatiu de pacients (possiblement més del 50%) acaba desenvolupament una poliartritis persistent i crònica complint els criteris diagnòstics d'AR. En conseqüència, està en debat si el RP és una entitat diferenciada o és només una forma pre-clínica d'AR¹⁸⁶.

5.2. Perfil biològic d'autoanticossos

Donat que en un nombre gran de pacients de RP es dona una progressió cap a AR, resulta molt interessant l'anàlisi del tipus d'autoanticossos discriminatius per AR que aquests puguin presentar en el moment del diagnòstic de RP.

El FR està present en aproximadament la meitat dels pacients de RP¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. L'any 2003 es va descriure per primera vegada la presència d'ACPAs en una cohort de pacients de RP¹⁸⁸. La prevalença va ser del 56,6%, un valor proper a l'observat en pacients d'AR d'inici recent (52%)¹⁸⁵. Des d'aleshores, la presència d'ACPAs s'ha confirmat en múltiples estudis i la prevalença s'ha estimat entre el 40 i 70%^{185,189,190}.

En resultats publicats pel nostre grup s'ha observat que tot i que les concentracions en les que s'observen els ACPAs en pacients de RP són similars a les de les trobades en pacients d'AR, la seva resposta és diferent.

En el cas dels pacients de RP s'ha observat que la detecció d'especificitats fines diferents està més restringida i el patró d'isotips detectables en la malaltia també són diferents. L'isotip IgG és clarament el preferentment emprat mentre que IgA i IgM s'utilitzen en menor freqüència en el grup de RP¹⁹¹.

Finalment, també en resultats publicats recentment en el nostre grup, s'ha pogut determinar la presència d'anticossos de la família anti-CarP en sèrums de pacients de RP. En un estudi que va incloure 54 pacients de RP i 54 pacients d'AR, es va poder concloure que en el grup de RP, el 24% dels pacients presentava resposta anti-CarP, un valor inferior al del grup d'AR on la prevalença era del 64%. El comportament dels anti-CarP sembla que és similar al dels ACPA, ja que en els pacients de RP la resposta també va ser més restringida en termes d'isotips emprats¹⁹².

La resposta d'autoanticossos detectada en pacients de RP serveix per confirmar el paper de la autoimmunitat en aquesta malaltia. Aprofundir en l'estudi d'aquests autoanticossos pot ajudar a entendre millor els mecanismes que es poden donar en el RP, malaltia de la qual no es coneix la fisiopatologia. Les diferències observades amb l'AR obren la porta a realitzar nous estudis per poder entendre millor la relació que hi pot haver entre les dues malalties i determinar si efectivament podria ser que el RP formés part de l'espectre ampli que s'observa de manifestacions d'AR, alhora que podria ajudar a predir millor quins pacients amb RP acabaran desenvolupant una AR.

5.3. Estudi PALABA

Com a part dels treballs realitzats en la tesi doctoral es presentaran alguns resultats preliminars que formen part de l'estudi PALABA. Aquest estudi és un assaig clínic aleatoritzat multicèntric que s'està duent a terme amb l'objectiu d'estudiar les diferències en l'evolució del RP de pacients de diagnòstic recent tractats amb dos fàrmacs diferents, la hidroxicloroquina i l'abatacept. La hipòtesi plantejada és que els pacients seropositius (ACPA+ i/o FR+) de RP tractats amb abatacept reduiran la progressió cap a AR en comparació a aquells amb les mateixes característiques tractats amb hidroxicloroquina¹⁹³.

6. PÈPTIDS SINTÈTICS I EL SEU ÚS EN DIAGNÒSTIC

En els apartats previs s'ha fet un resum dels factors que estarien implicats en els inicis d'AR, així com un resum de la seva fisiopatologia i dels diferents tipus d'autoanticossos presents en aquesta malaltia i que la caracteritzen. S'han vist també de forma resumida els actuals criteris diagnòstics, que tot i que presenten una part que està basada en l'evidència serològica, deixen clara la necessitat de millorar les eines que existeixen actualment. Aquesta millora és necessària tant per classificar de forma efectiva els diferents subgrups de pacients que formen el global d'una malaltia tant heterogènia com per entendre si realment el subgrup de pacients fins ara considerat seronegatiu realment ho és o el problema es basa en que no s'han descobert els antigens que podrien ajudar a la detecció d'anticossos en els sèrums d'aquests pacients.

En base a aquestes necessitats, i d'acord a les àmplies informacions que es tenen de l'ús de pèptids sintètics com a eines per la detecció d'anticossos en diferents contextos, en aquesta tesi s'ha treballat en el disseny, síntesi i estudi de diferents estructures peptídiques. A continuació, es farà una breu introducció dels pèptids sintètics i de diferents consideracions que s'han pogut anar determinant al llarg dels anys sobre aquesta eina per tal de fer-la més efectiva en la tasca de la detecció de biomarcadors serològics. El desenvolupament d'eines diagnòstiques per la detecció d'anticossos que serveixen com a biomarcadors específics de la malaltia requereix d'estudis previs de caracterització de la resposta humoral.

6.1. Estudi i caracterització d'epítops

El desenvolupament de proves que permetin la detecció serològica d'anticossos i el seu ús com a biomarcadors requereix l'estudi dels epítops reconeguts en cada malaltia. Els epítops són els determinants antigènics o porcions dels antigens que són reconeguts pels anticossos. Solen formar part de proteïnes o altres macromolècules com els polisacàrids¹⁹⁴. El fet que aquest tipus de molècules siguin antigèniques implica que presenten l'habilitat de ser reconeguts de forma específica per anticossos que formen part d'una resposta immunitària¹⁹⁵.

Els epítops es poden diferenciar en dos grans grups en funció de la posició dels aminoàcids que el conformen en la seva seqüència primària. Segons aquesta descripció, el primer grup són els epítops continus, que estan conformats per seqüències lineals curtes d'aminoàcids, és a dir, seqüències d'aminoàcids contigus dins l'estructura primària que són reconegudes pels anticossos (Figura 8A). També reben el nom d'epítops seqüencials¹⁹⁶.

El segon grup és un altre subtipus d'epítop on el fragment reconegut no és una seqüència d'aminoàcids contigus en l'estructura primària sinó aminoàcids que es presenten en posicions contigües en l'espai com a conseqüència del plegament tridimensional de la proteïna (Figura 8B). Aquests epítops reben el nom de discontinus o conformacionals^{197,198}.

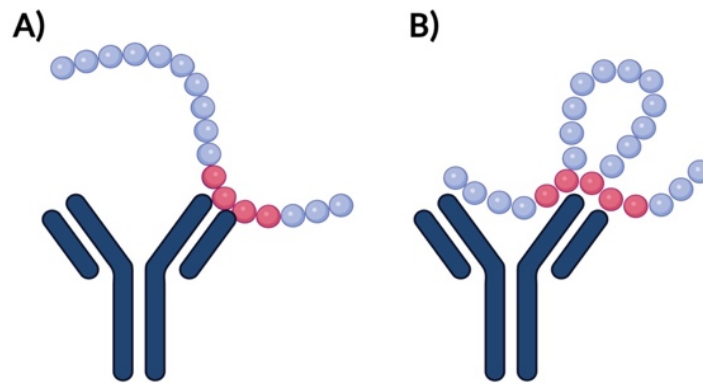


Figura 8: Representació dels tipus d'epítops que poden presentar-se. (A) Epítop continu i (B) Epítop discontinu. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

L'estudi dels epítops és necessari per l'estudi de la resposta immunitària i la comprensió de la fisiopatologia i etiologia de les malalties en les quals hi ha una implicació del sistema immunitari. En recerca també resulta útil pel desenvolupament d'assaigs diagnòstics i pel seguiment de la malaltia mitjançant la detecció de biomarcadors com els anticossos¹⁹⁹.

6.1.2 Identificació d'epítops

L'estudi i la identificació dels epítops està habitualment centrada en l'estudi d'epítops continus, ja que són més senzills d'aïllar o analitzar amb les tècniques que es descriuran a continuació. Tot i que la majoria d'epítops es considera que són discontinus (o conformacionals), el seu estudi és més complex principalment perquè la seva predicció requereix un estudi de la conformació tridimensional de la proteïna, que no està disponible en algunes d'elles²⁰⁰. L'aïllament d'epítops discontinus és també complex ja que requereix de l'ús de *scaffolds* com a estructures que permetin mantenir la conformació tridimensional pel seu posterior estudi^{199,201}.

La identificació dels epítops continus, dels quals es tractarà a continuació, es pot donar mitjançant diferents tècniques en funció de l'enfocament utilitzat. Es pot tractar d'aïllar els epítops quan estan units a l'anticòs, però també es pot dur a terme una anàlisi de diferents pèptids derivats de la proteïna antigènica per intentar acotar la resposta a una fracció molt més restringida.

6.1.2.1 Aïllament dels epítops

Històricament, l'estudi i identificació de les seqüències que formen els epítops s'ha basat en l'ús de digestions enzimàtiques de proteïnes per generar fraccions més petites amb l'objectiu de detectar de forma conjunta el fragment petit de proteïna que presentés l'anticòs unit i així poder-ne identificar la seqüència²⁰². Al llarg dels anys, s'han anat desenvolupant tècniques que han permès la identificació dels epítops basant-se en l'estudi de la interacció entre antigen i anticòs de manera més eficient.

Entre les diferents tècniques que es fan servir s'inclou una tècnica clàssica com la cristal·lografia, en la qual es busca la co-cristal·lització de l'estructura de l'anticòs unit a l'epítop per poder identificar-ne correctament l'estructura²⁰³. L'avenç de la cristal·lografia ha permès l'estudi de proteïnes grans i la interacció entre proteïnes, com la interacció antigen-anticòs, i ha fet que sigui el *gold standard* per l'anàlisi estructural de les interaccions d'aquest tipus²⁰⁴.

També s'han emprat tècniques més senzilles com la proteòlisi de proteïnes seguida per una anàlisi d'espectrometria de masses amb l'objectiu d'identificar els fragments de l'epítop que es poden trobar a la mostra^{205,206}. Aquestes tècniques, juntament amb la ressonància magnètica nuclear²⁰⁷, una altra eina que permet la identificació dels antígens i la seva estructura, es basen en l'aïllament i identificació de l'antigen quan aquest està unit al anticòs.

6.1.2.2 Estudi de la interacció entre anticossos i pèptids sintètics

Un altre enfocament en la recerca dels antígens implicats en la resposta immunitària humoral consisteix en la cerca d'epítops mitjançant la síntesi i/o anàlisi de múltiples pèptids, seguit d'un estudi de la seva capacitat d'unió als anticossos. El desenvolupament de tècniques efectives com la síntesi en fase sòlida de pèptids descrita per Merrifield²⁰⁸ ha permès l'obtenció de pèptids amb un alt grau de puresa, i que poden ser immobilitzats en immunoassaigs pel seu estudi com a potencials antígens. Des del desenvolupament d'aquesta tècnica, s'han dissenyat i comercialitzat sintetitzadors automàtics que permeten la síntesi simultània de múltiples pèptids.

Es tracta d'una eina que facilita l'obtenció de biblioteques de pèptids sintètics que presenten solapament d'aminoàcids i que permeten identificar quins són els aminoàcids més rellevants de la seva estructura, i de forma general els pèptids que presenten una major capacitat antigènica^{141,144}.

Recentment, també s'han desenvolupat eines computacionals que permeten dur a terme una predicció de les interaccions teòriques que hi hauria entre un pèptid generat a l'atzar i un anticòs d'estudi i conseqüentment permeten la creació de biblioteques de pèptids amb un potencial antigènic teòric²⁰⁹, que reben el nom de mimotops. El terme "mimotop", segons la seva descripció original per part de Geysen et al.²¹⁰ fa referència a una macromolècula, freqüentment un pèptid, que imita l'estructura d'un epítop. Actualment, es consideren mimotops els seleccionats de les llibreries de pèptids, generades a l'atzar, que presenten una alta capacitat d'unir-se a un anticòs dirigit a un antigen concret²¹¹.

Són també útils per identificar els residus de dins l'epítop que tenen un paper clau en la unió de l'anticòs i per generar seqüències consens rellevants en l'epítop d'estudi²⁰⁹. També s'han desenvolupat biblioteques de pèptids generades a partir de l'anàlisi de l'ADN emprant tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS, de l'anglès *next generation sequencing*)²¹². L'ús d'aquestes eines sol anar associat a una anàlisi posterior dels diferents pèptids mitjançant tècniques de laboratori, com els ja mencionats immunoassaigs^{213,214}.

Un cop ha estat analitzada aquesta resposta i s'ha determinat que els pèptids estudiats formen part d'epítops, es poden emprar com a antigens per l'estudi i el desenvolupament de tests diagnòstics o pel seu ús en la generació de vacunes per estimular una resposta immunitària, entre d'altres^{215,216}.

6.2. Ús dels pèptids sintètics com a antigens pel diagnòstic

L'ús de pèptids sintètics com antigens en plataformes de diagnòstic és un camp en expansió²¹⁷. El desenvolupament d'immunoassaigs basats en l'ús de pèptids ha donat lloc a tests per la detecció d'anticossos com a biomarcadors per diferents malalties^{218,219}, però també s'han pogut desenvolupar tests amb funcions i utilitats força àmplies com la detecció de toxines en mostres alimentàries²²⁰, detecció d'infeccions víriques²²¹⁻²²³, o per diferents analits com proteïnes, ions metàl·lics o àcids nucleics²²⁴. Existeixen actualment diferents tests diagnòstics basats en l'ús de pèptids que han estat comercialitzats^{140,225,226}. L'ús de pèptids sintètics presentats com antigens en plataformes d'immunoassaig comporta una sèrie d'avantatges i inconvenients respecte altres estratègies que es descriuen a continuació.

6.2.1. Principals avantatges

Des del desenvolupament de la biotecnologia a l'inici dels anys 1990, moltes eines de diagnòstic basades en l'ús d'immunoassaigs en fase sòlida, com els ELISA o els assajos multiplex, s'han basat en la presentació d'antígens com les proteïnes recombinants²¹⁶. Les proteïnes recombinants són generades artificialment al laboratori²²⁷. En aquests immunoassaigs també es poden presentar estructures natives, purificades a partir de mostres naturals. Les proteïnes, ja siguin recombinants o natives són encara àmpliament emprades i presenten utilitat diagnòstica tot i que presenten alguns inconvenients. En ambdós casos, l'obtenció d'aquest tipus d'antígens es laboriosa i costosa, especialment en les quantitats que es requereixen per dur a terme els immunoassaigs^{216,228}.

A més, com que es tracta de molècules grans, és més difícil caracteritzar-les de forma completa i com a conseqüència, es poden trobar diferències entre preparacions de proteïna de diferents moments o lots, limitant la reproduïbilitat de l'assaig²²⁹. Un altre aspecte a considerar en l'ús de proteïnes senceres, ja sigui natives o recombinants, és que és difícil limitar-ne les interaccions no específiques, de tal manera que en algunes ocasions generen un alt soroll de fons en les lectures d'absorbància dels immunoassaigs, dificultant la lectura de la resposta específica que es permet detectar²³⁰. Precisament també per la complexitat de les proteïnes, s'han detectat en algunes ocasions reactivitats creuades no desitjades que alteren la resposta que s'està analitzant de manera concreta²³¹.

Els pèptids sintètics presenten múltiples avantatges que permeten minimitzar alguns dels inconvenients que s'han esmentat en relació a les proteïnes. Com que es tracta de molècules químiques molt ben definides i que es poden caracteritzar completament amb l'ús de tècniques relativament senzilles²³², permeten minimitzar la presència de les respostes no específiques i de les reactivitats creuades. La disminució de la reactivitat creuada alhora potencia la sensibilitat i especificitat d'aquests antígens²³³. La caracterització prèvia d'aquestes molècules a la seva incorporació a un assaig en el qual les condicions estan optimitzades, permet la presentació d'un antigen homogeni en l'estudi i una major reproduïbilitat dels resultats obtinguts²³⁴.

A més, degut a que la seqüència dels pèptids és coneguda es poden dissenyar altres pèptids sintètics com a controls de la reactivitat específica del fragment, o inclús de l'efecte d'aminoàcids individuals. Aquest seria el cas, per exemple, d'estudis en que es pretén determinar la reactivitat contra una modificació post-traducciona. L'ús del pèptid amb la PTM i l'ús paral·lel d'un altre

pèptid amb la mateixa seqüència però amb l'aminoàcid sense modificar és útil per determinar de forma específica la resposta a la PTM^{141,144,158}.

S'ha descrit també l'ús de pèptids control, anomenats "*scrambled*", un anglicisme que serveix per definir pèptids que contenen els mateixos aminoàcids que la seqüència d'estudi però de forma desordenada, i que tenen utilitat per poder entendre l'efecte de la posició de cada aminoàcid dins l'estructura^{235,236}. D'aquesta manera, es pot arribar a fer una anàlisi molt exhaustiva de la implicació de cadascun dels aminoàcids que pot ser útil, per exemple, per determinar la importància i l'efecte dels aminoàcids que es troben flanquejant la seqüència²³⁷ que forma part de l'epítot.

La síntesi manual de pèptids sintètics permet la introducció de les modificacions desitjades en la seva estructura química d'acord d les necessitats de cadascun dels tests que s'han de desenvolupar. Per exemple, es poden incorporar estructures químiques com la biotina, per poder unir-los fàcilment a plaques tractades amb avidina, o bé la introducció de residus de cisteïna o àcids grassos que en modifiquen la forma per aconseguir l'estructura de l'antigen que es vol presentar^{216,234}. També permet la introducció de PTMs de forma totalment controlada, ja que la unió dels aminoàcids amb PTMs es fa seguint el mateix protocol de síntesi en fase sòlida habitual^{125,238}.

Un altre avantatge dels pèptids sintètics és que la seva obtenció amb un alt grau de puresa en quantitats relativament elevades permet que l'epítot es pugui presentar en concentracions més altes en els immunoassaigs que en el cas de les proteïnes. En aquestes, on l'epítot forma només una part petita del global, aquesta concentració és molt inferior i per tant la resposta detectada també sol ser més baixa. Utilitzant els dos tipus d'antígens en la mateixa concentració, la molaritat del epítot peptídic serà significativament més alta que la del epítot en tota la proteïna. D'aquesta manera, en augmentar-ne l'exposició, pot augmentar la resposta detectada^{230,233}.

6.2.2. Principals inconvenients

6.2.2.1. Manca de conformació estructural dels pèptids linears

Un dels inconvenients més rellevants que presenten aquest tipus de pèptids curts sintètics és la dificultat d'adoptar la conformació nativa quan els pèptids es troben en solució donada la seva elevada mobilitat²³⁹. Com a conseqüència, la unió dels anticossos és menor per la falta d'afinitat tot i que la seqüència formi part de regions antigèniques²⁴⁰. Com que les estructures que formen part dels epítops solen estar localitzades en regions accessibles de les proteïnes, la conformació tridimensional que adoptin els pèptids sintètics és especialment rellevant per tal de mimetitzar l'estructura que presenten les proteïnes i augmentar l'antigenicitat²⁴¹⁻²⁴³.

Estabilitzar l'estructura dels pèptids sintètics permet que la seva orientació millori i que la seva presentació com antigens sigui més estable^{244,245}. S'han descrit diferents tècniques per restringir l'estructura peptídica dels pèptids en solució, entre les quals destaca la ciclació intramolecular que permet que s'adopti una estructura estable de forma molt eficient²⁴⁶⁻²⁴⁸. La ciclació es pot induir seguint diferents metodologies com la lligació química²⁴⁹ però també seguint estratègies més simples com la introducció de cisteïnes en la seqüència primària del pèptid. Les cisteïnes es poden introduir substituint residus de serina presents de forma natural amb els quals comparteix un alt grau d'homologia estructural. L'oxidació dels grups tiol d'aquests aminoàcids dona lloc a la formació d'un pont disulfur entre aquests dos residus¹³⁸. Habitualment, per tal de poder induir la formació d'aquesta estructura, es treballa amb cisteïnes protegides per grups idèntics com l'acetamidometil¹⁴⁴. Així, quan són eliminats en presència de iode, simultàniament es pot generar el pont disulfur. Amb aquesta estratègia de ciclació dels pèptids, es permet que la seqüència adopti una conformació constreta i fixada²⁵⁰. Ha estat àmpliament utilitzada en diferents estudis en els quals s'ha demostrat la ciclació del pèptid augmenta l'antigenicitat de l'estructura presentada respecte la presentació del mateix pèptid sense ciclar^{140,251}.

6.2.2.2. Dificultats en la unió dels pèptids al suport sòlid

Un altre dels principals inconvenients que s'han observat en l'ús de pèptids sintètics linears és la dificultat d'aconseguir una adsorció passiva homogènia en les plaques de poliestirè, com les plaques emprades en els protocols d'ELISA, per poder realitzar els immunoassaigs²⁵². A causa del baix nivell d'adsorció és difícil no només aconseguir una unió homogènia en termes de quantitat del pèptid adherit en cada pouet sinó que a més també ens podem trobar amb un pèptid presentat de forma heterogènia pel que fa al seu posicionament i orientació espacial un cop adherit al plàstic. Les interaccions entre el pèptid i el plàstic fan que l'exposició correcta del pèptid a vegades es vegi alterada d'una forma poc controlable^{216,253}.

Per poder aconseguir resultats que siguin reproduïbles s'han descrit tècniques diverses com la conjugació del pèptid d'assaig a proteïnes, de tal manera que són aquestes les que queden absorbides a la placa^{254,255}, o la modificació dels pèptids amb cues hidrofòbiques d'àcids grassos que ajuden a l'orientació dels pèptids en la placa²⁵⁶. Altres enfocaments han descrit com la unió del pèptid d'interès a una cua de poli-lisina també n'augmenta la unió^{257,258}. Per altra banda també s'ha descrit l'existència de pèptids que presenten una alta afinitat pel poliestirè²⁵³ i que units al pèptid d'interès i actuant com a *tags* peptídics, permeten que aquest quedi adsorbit a la placa i en permet controlar l'orientació^{253,259}.

L'alternativa als mètodes que intenten augmentar la unió dels pèptids al suport sòlid per adsorció és induir la unió covalent del pèptid a les plaques. Per dur a terme aquest procés es requereix habitualment l'activació o bé de la placa o bé del pèptid. En el cas de l'activació de la placa es fa referència a la preparació de la superfície sòlida perquè presenti grups que reactius que interaccionin amb el pèptid i es formi l'enllaç d'unio covalent. Normalment es tracta de grups electrofílics com els epòxids^{260,261}, aldehids²⁶² o funcionalitats com els succinimidil esters o isotiocianat²⁶³, que reaccionen amb els grups nucleofílics com els grups amino dels pèptids²⁶⁴. En el cas de l'activació del pèptid, trobem tècniques com la introducció d'una cisteïna en l'extrem N-terminal o C-terminal del pèptid per posteriorment conjugarlo a una proteïna que ha estat prèviament activada amb maleïmida amb la qual forma un enllaç tioèter²⁶⁵.

S'ha vist que la presentació dels pèptids fent ús d'enllaços covalents presenta millores en relació a la presentació i detecció dels antígens respecte la unió passiva per adsorció^{216,234}.

Una altra estratègia d'unió dels pèptids a la placa és l'ús de les unions del tipus avidina-biotina²⁶⁶. Es tracta d'un enllaç bioquímic, no covalent però extremadament fort, que es dona amb alta afinitat²⁶⁷⁻²⁶⁹. L'avidina és una proteïna glicosilada que prové de la clara de l'ou de rèptils i aus²⁶⁹. L'anàlisi de la unió biotina-avidina ha mostrat que l'ús d'avidina presenta un inconvenient pel seu ús en immunoassaigs, i és que l'avidina també s'uneix inespecíficament a altres molècules que poden estar presents en els tampons d'assaig o a les mostres d'anàlisi²⁷⁰, fet que pot donar lloc a un alt soroll de fons i en conseqüència alterar el resultat obtingut²⁷¹. Diferents estudis han descrit anàlegs de l'avidina com l'estreptavidina, que prové del bacteri *Streptomyces avidinii*²⁷² i la neutravidina, que és una versió modificada químicament de l'avidina²⁷³. En tots dos casos, la diferència principal respecte l'avidina es troba en la manca de glicosilacions. Aquesta diferència provoca que aquests dos anàlegs a pH fisiològic presentin càrrega neutra i en conseqüència no interaccionin amb altres proteïnes de forma no específica²⁷⁴. Per aquest motiu, a nivell experimental es sol treballar amb els dos anàlegs^{275,276}.

Per poder unir el pèptid a la placa, que presenta un anàleg de l'avidina, aquest ha d'estar derivatitzat amb un grup biotina. S'ha descrit que aquest tipus de marcatge en algunes ocasions pot comportar una pèrdua de sensibilitat de l'assaig degut a que la biotina pot interferir amb el posicionament del pèptid i emascarar-ne parcialment l'exposició²⁷⁷. Per ajudar a resoldre aquest problema, s'han dissenyat diferents tipus d'espaiadors units a la biotina que permeten que es generi una distància suficient entre la biotina i el pèptid i es redueixi així el problema de l'emascarament. En un estudi comparatiu, publicat per Andresen et al.²⁷⁸, s'ha descrit com l'ús de l'espaiador millora la sensibilitat general de l'assaig. A més, d'entre els espaiadors testats, l'ús del polietilenglicol és el que ha donat millors resultats.

Un altre factor que pot afectar a l'exposició del pèptid un cop unit a la placa és la posició en la qual s'acobla la biotina. La unió de la biotina a un extrem del pèptid, N-terminal o C-terminal, contribueix a que l'estructura del pèptid quedi ben exposada i ho faci de forma orientada i sempre en la mateixa posició^{279,280}.

6.2.2.3. Estratègies per augmentar l'antigenicitat dels pèptids sintètics

L'ús de pèptids sintètics com antígens genera molt d'interès degut als amplis avantatges que presenta en diferents aspectes i que s'han mencionat anteriorment. Per aquesta raó, s'han dut a terme estudis amb l'objectiu de trobar tècniques que permetin millorar-ne la sensibilitat i especificitat com antígens. Entre les tècniques descrites destaca la possibilitat de millorar l'antigenicitat d'una molècula peptídica fent que aquesta mostri més d'un epítot de forma simultània. És a dir, que el pèptid d'assaig estigui compost per dues fraccions i cadascuna d'aquestes presenti un epítot. La presentació de dos epítots de forma simultània és senzilla ja que es pot dur a terme la síntesi dels dos fragments de forma seqüencial donant lloc a un únic pèptid que rebrà el nom de quimèric. S'ha demostrat que els pèptids quimèrics mostren una major antigenicitat que els dos fragments que els conformen, o pèptids monomèrics de forma individual. Els pèptids quimèrics són una bona alternativa com a antígens per el seu ús en la detecció d'anticossos ^{138,216,234,281-283}.

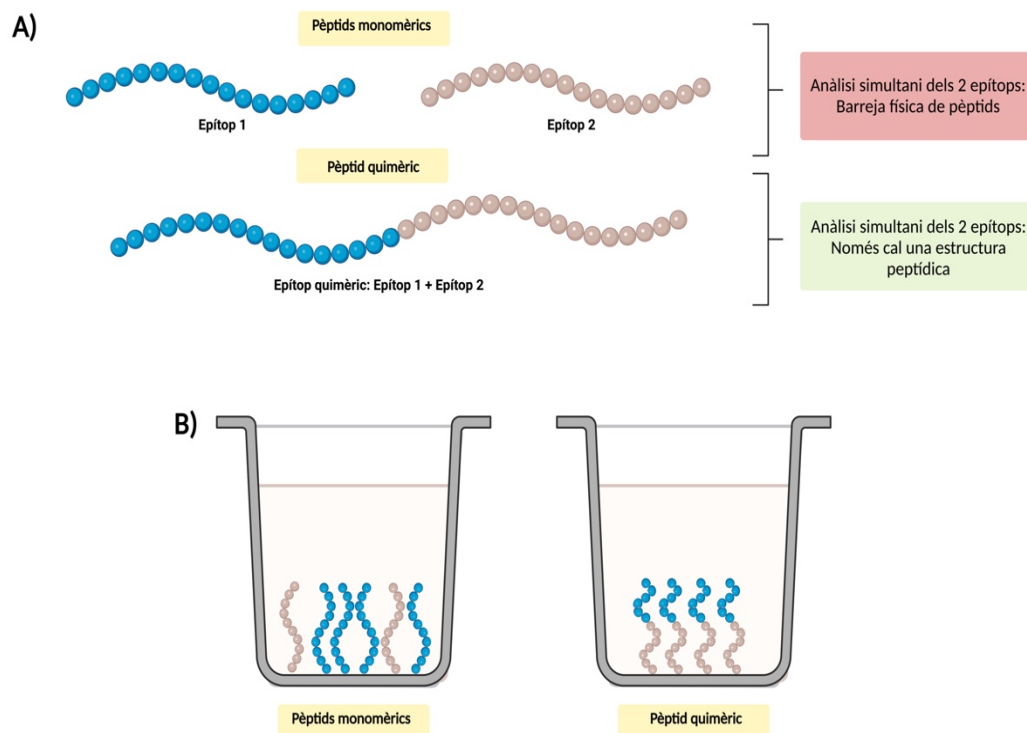


Figura 9: Representació d'un exemple gràfic dels pèptids monomèrics i pèptids quimèrics. A) Representació de l'estructura dels dos pèptids monomèrics i del pèptid quimèric que resulta de la unió dels dos monomèrics. Explicació breu del procediment per dur a terme un anàlisi simultània de les dues estructures monomèriques o de l'estructura quimèrica. B) Representació visual de com es podria donar la unió d'aquests pèptids en un suport sòlid i que exemplifica com la barreja física dels dos pèptids monomèrics pot donar lloc a variacions en la presentació de cadascun dels pèptids i en una presentació heterogènia dels epítots d'estudi. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com.

L'ús de pèptids quimèrics garanteix una presentació homogènia dels antígens de l'immunoassaig i presenta millors resultats que els que s'obtenen si es du a terme la mateixa anàlisi emprant les dues molècules monomèriques de forma simultània, en forma de barreja física. Amb la barreja física no es pot garantir una homogeneïtat de la presentació dels dos pèptids monomèrics²⁸⁴ (Figura 9).

Una altra alternativa per mostrar múltiples antígens de forma simultània en un mateix pèptid és l'ús de MAPs (de l'anglès *multiple antigen peptide*). La síntesi d'aquest tipus de pèptids, que presenten una estructura ramificada i no lineal, es basa en l'ús d'aminoàcids com la lisina, que presenta dos grups amino (α -amino i ϵ -amino) sobre els quals es pot seguir la síntesi del pèptid desitjat. Es pot acoblar més d'una lisina per donar lloc a diferents ramificacions en el pèptid. Una altra tècnica per poder sintetitzar MAPs consisteix en la lligació química de diferents pèptids que es troben desprotegits^{138,285,286}.

6.3. Tipus d'immunoassaigs emprant pèptids sintètics com antígens

La recerca per l'optimització de l'assaig no ha estat centrada de forma exclusiva en els pèptids sintètics i en el seu paper com antígens sinó que també s'han donat avenços en la preparació de diferents tipus d'immunoassaigs i els mètodes emprats per realitzar-los de forma optimitzada i eficient. Gràcies a la recerca en aquest camp, s'ha pogut avançar en l'optimització de molts protocols d'immunoassaigs de tipus ELISA mentre que de forma simultània s'han desenvolupat altres tipus d'immunoassaig en fase sòlida com són els microarrays. A continuació es descriuran les dues tècniques.

6.3.1. ELISA

Els ELISA són un tipus d'immunoassaig fonamentats en l'especificitat de la unió dels anticossos als seus respectius antígens. Gràcies a la determinació d'aquesta unió, permet quantificar la presència d'antígens, emprant com esquers els anticossos o a la inversa, permet quantificar la presència d'anticossos emprant com esquers els antígens específics²⁸⁷. L'assaig d'ELISA es caracteritza per la seva versatilitat, sensibilitat, rapidesa i fiabilitat²⁸⁸.

La detecció de l'analit que es pretén quantificar es du a terme mitjançant la immobilització de l'altre molècula (del parell antigen/anticòs) amb la qual reacciona en un suport sòlid. El sistema més emprat per dur a terme els assaigs d'aquest tipus són les plaques de poliestirè, habitualment

en un format en el que es presenten 8 files i 12 columnes de pous que poden contenir fins a 350µL de reactiu en els quals es dona individualment la quantificació d'una mostra d'assaig²⁸⁹.

Els passos bàsics i fonamentals de l'ELISA consisteixen en la immobilització dels antígens o bé dels anticossos en el suport sòlid i la posterior addició de la mostra en el pou d'assaig per tal que es doni la interacció entre l'antigen o anticòs immobilitzat i l'antigen o anticòs present en la mostra. Per tal de poder quantificar aquesta unió, s'aplica posteriorment un anticòs secundari que està conjugat a un enzim²⁸⁹. L'enzim escollit en funció de l'assaig que es vol dur a terme, en presència del substrat adequat, genera una reacció que és quantificable per absorbància, fluorescència o luminescència²⁹⁰. Entre aquests passos es duen a terme rentats dels pous amb tampons específics per aquest propòsit per tal d'eliminar els reactius que no s'hagin unit de forma específica i quantificar de forma específica la unió antigen/anticòs^{289,291}.

En funció del tipus de determinació que es vol dur a terme o tipus de mostres analitzades existeixen diferents tipus d'ELISA (Figura 10).

- 1) **ELISA directe:** És l'ELISA més senzill i el primer en ser desenvolupat. Va ser desenvolupat per Engvall et al.²⁹² i Van Weemen et al.²⁹³ de forma simultània. És útil per quantificar antígens amb alt pes molecular. Consisteix en la immobilització de l'analit d'interès al suport sòlid. Posteriorment s'addiciona l'anticòs conjugat a l'enzim i es du a terme la quantificació de la mostra. Aquest tipus d'assaig es sol dur a terme quan es treballa amb mostres purificades (Figura 10-1)^{287,291}.
- 2) **ELISA indirecte:** Consisteix en la immobilització de l'antigen en el suport sòlid. Posteriorment s'addiciona la mostra que conté l'anticòs primari, que es vol quantificar, i posteriorment s'afegeix l'anticòs secundari conjugat a l'enzim que permetrà la quantificació final. És el tipus d'ELISA que s'utilitza per la quantificació d'anticossos com a biomarcadors i és el que s'ha dut a terme en els assajos que formen part d'aquesta tesi (Figura 10-2)^{287,291}.
- 3) **ELISA competitiu:** Es tracta del protocol més complex ja que requereix la realització de dos experiments en paral·lel. S'utilitza per detectar o quantificar antígens presents en baixes quantitats i és molt específic. En aquest assaig, un antigen de referència competeix amb l'antigen de la mostra analitzada per ser unit a l'anticòs d'interès.

El procediment, de forma simplificada, consisteix en la immobilització de l'antigen de referència sobre la placa. De forma paral·lela s'incuba un excés d'anticòs primari sense marcar amb l'antigen d'interès perquè es formin complexos antigen-anticòs. Quan s'ha donat aquesta interacció, la barreja de complexos antigen-anticòs primari generada s'afegeix a la placa on hi ha l'antigen de referència, on competirà amb aquest per unir-se a l'anticòs. Finalment, s'afegirà un anticòs secundari conjugat a un enzim que s'uneix a l'anticòs primari i, en presència del substrat, en permetrà la quantificació (Figura 10-3)^{287,291}.

- 4) **ELISA sandvitx:** Consisteix en la immobilització d'un anticòs al suport sòlid que rep el nom d'anticòs de captura. Seguidament s'introdueix la mostra que conté l'antigen que es pretén quantificar amb l'objectiu que quedi acoblat a l'anticòs de captura. Posteriorment s'addiciona l'anticòs de detecció, que també s'unirà l'antigen immobilitzat en l'anticòs de captura, donant lloc al sandvitx que dona el nom a la tècnica. La presència de l'anticòs de detecció serà quantificada mitjançant l'addició de l'anticòs secundari conjugat amb un enzim (Figura 10-4)^{287,291}.

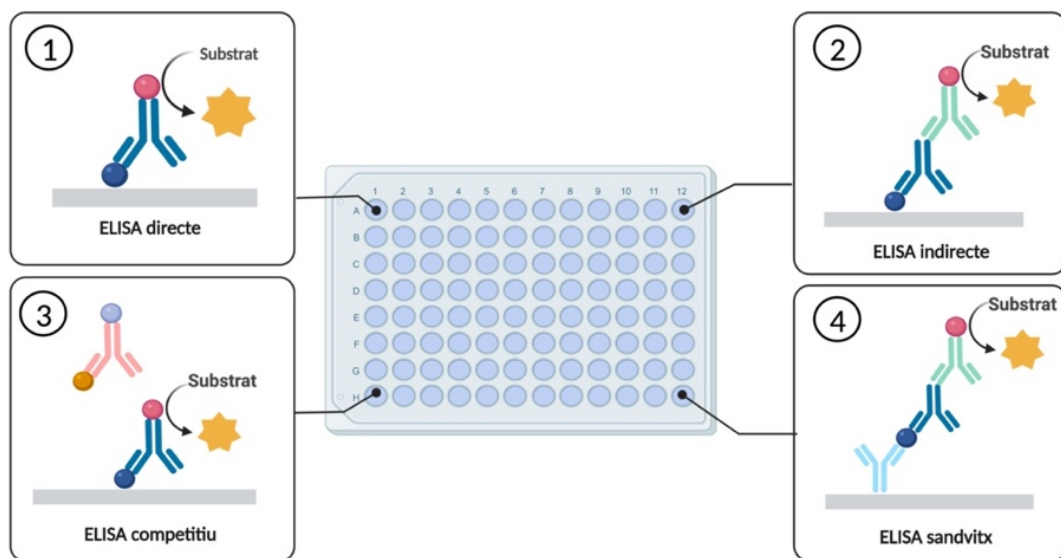


Figura 10: Representació gràfica de la unió antigen/anticòs que es dona en cadascun dels subtipus d'ELISA. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

La tècnica d'ELISA és àmpliament utilitzada ja que produeix resultats sensibles i específics en un temps curt i es pot aplicar a molts àmbits²⁹⁴. Presenten una alta sensibilitat que permet detectar les molècules d'estudi en concentracions de ng/mL a pg/mL²⁹⁵.

És un tipus d'assaig que es pot adaptar i optimitzar per la detecció de diferents molècules, fent-lo ideal en l'àmbit de recerca per tal de poder testar i treballar amb antígens preparats *de novo* i entendre el potencial que cadascun d'ells presenta. Els ELISA són especialment rellevants en el procés d'anàlisi i validació de biomarcadors degut a la reproduïbilitat de la detecció i quantificació de molècules en mostres²⁹⁶⁻²⁹⁸. En molts casos s'ha pogut estandarditzar els resultats fets en laboratoris diferents, factor que ha donat peu a la preparació de test ELISA que es consideren *gold-standard* per la detecció de biomarcadors en diferents malalties i li donen un valor alt com a eina diagnòstica²⁸⁷.

Durant la realització d'aquesta tesi s'han dut a terme diferents assaigs ELISA indirectes amb l'objectiu de determinar la utilitat dels diferents antígens preparats, la majoria d'ells peptídics, per detectar diferents anticossos que són emprats com biomarcadors en el context de l'AR.

6.3.2. Microarray

En els últims anys, el desenvolupament de microarrays ha permès que aquests es converteixin en una eina cada cop més emprada en el camp de la biomedicina²⁹⁹, i especialment en el del diagnòstic³⁰⁰. Els microarrays permeten l'anàlisi simultani de múltiples biomolècules que es troben immobilitzades en diferents tipus de substrat en una forma ordenada, i seguint un patró conegut, en la seva superfície³⁰¹.

Els substrats en els quals es troben immobilitzats es basen també en un suport sòlid com els vidres d'un portaobjectes²³⁴, les plaques de poliestirè³⁰² o fins i tot suports tridimensionals com les perles de poliestirè que posteriorment s'uneixen a un suport sòlid pla on es du a terme l'anàlisi³⁰³. Les molècules que es poden immobilitzar són de diferents tipus i inclouen fragments d'ADN³⁰⁴, hidrats de carboni³⁰⁵, proteïnes³⁰⁶, o com és en el cas en el que nosaltres treballem, pèptids^{234,307}.

En el cas dels pèptids, es pot donar la immobilització a una superfície sòlida però també es pot dur a terme in situ la seva síntesi amb sistemes emprant una quantitat molt baixa de reactius³⁰⁷.

Trobem diversos sistemes per poder donar la síntesi de pèptids in situ. El sistema SPOT és un mètode que es basa en l'ús d'aminoàcids protegits amb 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), que es van afegint seguint cicles de protecció i desprotecció, emprant reactius que s'apliquen dissolts³⁰⁸. Una altra variació respecte aquesta tècnica és l'aplicació dels aminoàcids protegits amb Fmoc en format partícula amb una impressora làser. Posteriorment, es fon la partícula i es pot dur a terme la reacció necessària per la síntesi dels pèptids in situ. Amb aquesta tècnica s'obté una major densitat peptídica^{309,310}. L'últim dels processos de síntesi in situ és el mètode fotolitogràfic, basat en l'ús d'aminoàcids protegits amb un grup fotolàbil. En aquest cas la síntesi depèn de la correcta desprotecció dels pèptids mitjançant l'ús de llum³¹¹.

La immobilització dels pèptids requereix la síntesi prèvia dels pèptids. Un cop es tenen les molècules peptídiques, es poden immobilitzar sobre el suport sòlid seguint diferents metodologies. Es pot donar per immobilització física en un procés anàleg al de l'adsorció que es dona en el format ELISA. Aquest mètode presenta l'inconvenient clar de que no permet controlar la disposició en la qual queda el pèptid sobre la superfície i també fa complicat controlar la densitat de pèptid que s'ha unit al suport sòlid, i per tant pot donar lloc a problemes en termes de reproduïbilitat^{307,312}.

També s'han desenvolupat mètodes per la immobilització biològica, basats en la interacció avidina-biotina o bé en altres interaccions lligand-receptor conegudes per donar lloc a una unió forta. En aquest cas les molècules també queden ben orientades degut a que la interacció es donarà sempre per la mateixa posició, la que presenti biotina, i per tant és controlable^{307,313,314}. En aquest cas es requerirà la presència d'espaiadors que permetin una correcta exposició del pèptid ja que sinó la resposta observada es veu afectada i la reproduïbilitat és baixa³¹⁵.

Finalment, entre els mètodes més emprats trobem els basats en l'ús d'unions químiques covalents. Se n'han descrit de molt diversos però la majoria es basen en la capacitat dels grups α -amino del pèptid per reaccionar amb els grups reactius presents al suport sòlid i donar lloc a una unió covalent. Aquests mètodes permeten la immobilització de les estructures amb la disposició correcta per poder emprar els pèptids com antígens i determinar-ne la reactivitat^{302,316-318}. En funció del tipus d'assaig que es vol dur a terme es pot emprar una estratègia química diferent. En el cas de la presentació de pèptids com a eines pel diagnòstic, són útils algunes estratègies que no requereixen cap activació ni modificació prèvia del pèptid. És un exemple d'aquest tipus d'unió els enllaços que es donen entre els grups amino dels pèptids i els grups ester de succinimida o isocianat presentats a la superfície sòlida prèviament activada²⁶³.

Aquestes molècules, un cop immobilitzades han de ser estables i la seva unió al suport sòlid s'ha de mantenir en els diferents passos de l'immunoassaig al qual es sotmetran com a antigens³¹⁹. És important també el control de les unions inespecífiques per tal de poder reduir la senyal de fons i mesurar de forma correcta la presència de la senyal esperada³²⁰. En aquest cas, al dur a terme la detecció de diferents interaccions que requereixen la molècula de presències diverses, és més senzill que es donin aquestes interaccions no específiques, i en conseqüència més complex reduir el soroll de fons. És essencial l'optimització de les condicions de l'assaig per tal de reduir aquest factor³⁰².

Els microarrays peptídics desenvolupats són útils en camps com la recerca de fàrmacs, en els quals permeten, per exemple, la quantificació de la interacció entre lligands i receptors³²¹. A més, també són útils per la detecció de biomarcadors i per tant en l'àmbit del diagnòstic^{278,316}.

L'ús de microarrays presenta alguns avantatges respecte els assaigs immunoenzimàtics tradicionals (ELISA) sobretot pel que fa a la quantitat de reactius i volum de les mostres biològiques necessàries per tal d'obtenir resultats^{234,322}. L'immunoassaig en un format microarray o multiplex es dona, a nivell experimental, de forma similar a l'ELISA ja que els vidres que fan de suport sòlid es col·loquen en unes gradetes de silicó i plàstic, on queden subjectes, per poder dur a terme l'addició i eliminació dels diferents reactius requerits per cada pas. La impressió dels diferents spots de cada pèptid en el vidre es dona de forma ordenada i localitzada en l'espai de tal manera que es generen *arrays* individuals de tots els pèptids que han de ser analitzats per una sola mostra biològica. L'anàlisi individual de cadascun d'aquests *arrays* seria l'equivalent a l'anàlisi de cadascun dels pous de la placa d'ELISA, i per tant, en certa manera se'n podria considerar una versió miniaturitzada³²³.

En aquest sentit, també cal remarcar que tot i que la conveniència de l'ús d'aquesta tècnica és evident pel que fa al temps i reactius estalviats, cal tenir en compte que el processament i la interpretació dels resultats és més complex³²⁴. En aquest tipus d'assaig s'ha de tenir en compte la homogeneïtat dels spots i la densitat de la fluorescència observada i no únicament la lectura d'un valor d'absorbància³²⁵. Requereix una anàlisi de dades detallada que, a diferència del procés experimental, si que requereix un temps més llarg d'anàlisi. L'ús de software d'anàlisi de dades que permeti dur a terme de forma més eficient aquest procés serà també clau en l'expansió de la utilització d'aquesta tècnica³²⁴, que pot ser extremadament útil en la detecció de múltiples biomarcadors validats de forma molt eficient i en conseqüència també pot ajudar a la creació de

perfils biològics que poden ajudar tant a entendre el pronòstic com el millor tractament que es pot emprar.

El mètode d'ELISA i els microarrays presenten similituds i diferències pel que fa a la detecció d'anticossos i en funció del moment del procés de la validació de cada pèptid sintètic com antigen, serà més útil o eficient un mètode o l'altre.

En aquesta tesi s'ha treballat en l'anàlisi de diferents pèptids com a potencials antigens per la detecció d'anticossos en l'AR i per fer-ho, s'ha emprat la tècnica d'ELISA. Per altra banda, s'ha volgut també aprofundir en la utilitat dels microarrays analitzant la resposta de múltiples pèptids dels quals ja s'havia fet l'anàlisi prèvia per ELISA, per tal de veure si el rendiment d'aquest tipus d'assaig era vàlid pels nostres propòsits.

6.4. Tests actuals pel diagnòstic serològic en l'AR basats en l'ús de pèptids sintètics

La caracterització de biomarcadors serològics a nivell clínic en pacients d'AR o dels quals se sospita que poden patir AR es du a terme, en la rutina clínica, en format ELISA. La majoria dels assaigs emprats fan servir pèptids sintètics com a antigen.

Entre aquests tests trobem els que serveixen per detectar un dels biomarcadors més rellevants, els ACPA. El test més emprat és l'anomenat CCP (de *cyclic citrullinated peptide*) i, en la seva primera generació comercial, el test CCP1, es va basar en l'ús d'un pèptid derivat de la filagrina com a antigen en un ELISA indirecte¹⁴⁰. Per millorar l'antigenicitat d'aquest pèptid curt, se li van introduir dues cisteïnes a la seqüència d'aminoàcids a partir de les quals es va formar un pont disulfur per obtenir un pèptid cíclic i que presenta citrul·lines en la seva estructura. Emprant aquest pèptid es va aconseguir una alta especificitat (98%) amb una sensibilitat moderada (41%)¹⁴⁰, pel diagnòstic de l'AR.

Posteriorment, amb l'objectiu de millorar la sensibilitat, es va dur a terme un *screening* de 12 milions de pèptids provinents de biblioteques de pèptids sintètics dels quals es van escollir els que donaven millors resultats i va donar lloc al conegut com CCP2^{326,327}. Amb aquest pas es va aconseguir augmentar la sensibilitat del test comercial. S'estima que aproximadament el 70% de pacients d'AR presenten ACPAs que són detectats amb aquest test, i per tant són pacients anti-CCP (+)³²⁷. Diferents estudis han demostrat que aquest test també funciona millor que l'anterior (CCP1) en la predicció de quins pacients tindran un pitjor pronòstic a nivell radiogràfic

^{138,140,261,326,328-330}. Més endavant s'han desenvolupat versions més noves del test comercial com el test CCP3, que presenten característiques molt similars en termes de sensibilitat i especificitat respecte el CCP2, i que es pot emprar de forma comparable com a *gold-standard*³³¹.

La llicència per la preparació d'aquest test a nivell comercial, tant del CCP2 com del CCP3, està repartida a diferents empreses i en la majoria dels casos, a nivell clínic, es fa servir el test per detectar l'isotip IgG dels ACPA³²⁷. S'ha detectat que, tot i que els antigens presentats per les diferents cases comercials són els mateixos, en alguns casos el test de diferents marques mostra diferents sensibilitats i també canvia el valor del punt de tall de positivitat³³². També s'han comercialitzat tests per detectar els isotips IgA i IgM però es fan servir més habitualment en recerca^{326,333-335}.

A part d'aquest test per la detecció dels ACPAs, se n'han comercialitzat altres com l'anomenat test anti-vimentina mutada citrul·linada (anti-MCV)³³⁶. Es tracta d'un test basat en l'ús d'una isoforma de vimentina mutada, en la qual diverses glicines són substituïdes per arginines i que per tant són susceptibles a ser citrul·linades³³⁷, que es va identificar a partir d'anàlisi d'espectrometria de masses d'una mostra de fibroblasts humans i de mostres de líquid sinovial de pacients d'AR. Aquesta isoforma es va expressar i citrul·linar per poder ser emprada en la detecció d'anticossos mitjançant el mètode d'ELISA.

El grup que la va descriure va determinar que el test presentava una sensibilitat del 82% amb una especificitat del 98%, valors que eren superiors als reportats al mateix grup amb el test CCP2³³⁶. Estudis posteriors han mostrat resultats divergents pel que fa a la sensibilitat i especificitat d'aquest test, i han mostrat diferències en funció de la població estudiada. Els resultats semblen indicar que la detecció d'anticossos anti-MCV mostra millors resultats en la població d'artritis d'inici recent^{338,339}.

En comparatives realitzades en altres estudis entre el test anti-MCV i el test CCP2, s'ha mostrat que tots dos correlacionen bé, suggerint que hi ha reactivitat creuada entre els antigens de cada test³⁴⁰. En aquestes comparatives s'ha mostrat, però, que fixant l'especificitat a un valor alt com el que trobem en el test CCP2, la sensibilitat del test anti-MCV és inferior³⁴¹⁻³⁴⁵. Amb aquests resultats es podria confirmar que el test anti-MCV és útil en el diagnòstic de l'AR però no presenta millores generals respecte el test basat en l'ús de pèptids cíclics citrul·linats, que continua sent el *gold-standard*.

La identificació d'un pèptid citrul·linat derivat de l' α -enolasa, que va rebre el nom de CEP-1 (de l'anglès *citrullinated α -enolase peptide-1*)^{146,346}, també ha donat lloc a un test diagnòstic que s'ha comercialitzat, el test anti-CEP1. Recentment, en una meta-anàlisi comparant 24 estudis en els quals es duia a terme l'immunoassaig amb el pèptid CEP-1 com antigen, s'ha mostrat com la sensibilitat d'aquest és molt variable ja que en funció de l'estudi aquest s'ha trobat entre valors del 17,5-71% però la mitjana (44%) ha estat molt inferior a la del CCP2³⁴⁷.

A nivell experimental també s'han desenvolupat múltiples tests basats en pèptids com antígens. En el nostre grup s'han desenvolupat múltiples pèptids, monomèrics i especialment quimèrics, per a la detecció d'AMPAs^{125,141,142,144,261,348}. Entre ells destaca el pèptid quimèric amb parts de fibrina i filagrina citrul·linat ciclat que va rebre el nom, en anglès, de *citrullinated fibrin filaggrin cyclic peptide 1* (CFFCP-1). Tal i com es va poder determinar mitjançant l'assaig d'ELISA, presentava unes característiques diagnòstiques molt similars al gold-standard, CCP2^{142,261}. Aquesta estructura ha estat inclosa en diversos assaigs duts a terme en tesi i ha servit com a base pel disseny de nous pèptids que han estat també estudiats.

Objectius

HIPÒTESI

Els pacients d'AR presenten diferents tipus d'autoanticossos contra proteïnes/pèptids modificats (AMPA) que són útils com a biomarcadors serològics en el diagnòstic de la malaltia. No obstant, el diagnòstic serològic en clínica només arriba a detectar aquests biomarcadors en aproximadament el 70% dels pacients. El desenvolupament de nous assaigs i el disseny de nous antígens per la detecció i estudi de la resposta d'anticossos contra proteïnes/pèptids modificats (AMPA) amb rellevància en l'artritis reumatoide és clau i ens permetrà estudiar i entendre millor la relació de la resposta AMPA amb els diferents fenotips clínics, així com millorar el potencial diagnòstic dels sistemes de detecció actuals.

OBJECTIUS

- Dissenyar, desenvolupar i testar una plataforma múltiple, en la qual s'inclouran diferents pèptids citrul·linats, per la determinació de la resposta d'anticossos contra pèptids/proteïnes citrul·linats (ACPA) en una cohort de pacients amb AR.
- Determinar la capacitat diagnòstica, en termes d'especificitat i sensibilitat, de la resposta detectada mitjançant l'anàlisi de la resposta ACPA en una població d'AR, i dos grups control (població general i pacients amb artritis psoriàsica).
- Dissenyar i sintetitzar diferents pèptids quimèrics que incloguin múltiples modificacions post-traduccionals (PTMs) per ser emprats com antígens i determinar la resposta AMPA en una cohort de pacients d'AR establerta.
- Estudiar la relació de la resposta AMPA amb diferents característiques clíniques dels pacients amb AR establerta.
- Determinar la resposta d'anticossos contra proteïnes/pèptids modificats amb adductes de MAA en una cohort de pacients d'AR establerta.
- Estudiar la rellevància i potencial ús diagnòstic dels autoanticossos anti-MAA com a biomarcadors d'AR.
- Determinar les diferències en el reconeixement d'epítops entre un grup de pacients de reumatisme palindròmic de diagnòstic recent i un grup de pacients d'AR establerta mitjançant l'anàlisi de la resposta AMPA a diferents antígens i diferents isotips.

Materials i mètodes

Taula 3: Reactius, dissolvents i altres productes emprats en la síntesi, purificació i caracterització dels pèptids i relació de cases comercials on s'han obtingut.

Casa comercial	Reactius i/o dissolvents
Agilent	Reactors Bond-Elut amb filtre
Novabiochem	Resina NovaSyn TGR Aminoàcids
Fisher Scientific	Acetonitril (ACN)
Scharlau	Dimetilformamida (DMF) Àcid trifluoroacètic (TFA) Àcid acètic (AcOH)
Panreac	Àcid clorhídric (HCl) Dietilèter Diclorometà (DCM) Ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona) Resina Amberlite MB-3 Fenol Etanol absolut Acetona Cianur de potassi (KCN) Cianat de potassi (KCNO) N-metilpirrolidona
Merck/Sigma- Aldrich/Fluka (Merck Group)	N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) N,N-Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) 1-Hidroxibenzotriazol (HOBT) Piperidina Triisopropilsilà (TIS) 2-mercaptoetanol Iode (I ₂) Àcid ascòrbic Piridina Metanol (MeOH) Cloroform Toluè N-biotinil-NH-(PEG) ₂ -COOH
Multisyntech	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfoni (PyBOP)
Carlo Erba	2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (Cloranil)
Genscript	Hexafluorofosfat d'O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni (HATU)

Taula 4: Reactius, dissolvents i altres productes emprats en els diferents immunoassaigs i relació de cases comercials on s'han obtingut.

Casa comercial	Reactius i/o dissolvents
Merck/Sigma-Aldrich/Fluka (Merck Group)	Hidrogen carbonat de sodi (NaHCO ₃) Tris(hidroximetil)-aminometà (TRIS) Dihidrogen fosfat de potassi (KH ₂ PO ₄) Di-sodi hidrogen fosfat anhidra (Na ₂ HPO ₄) Clorur de potassi (KCl) Àcid sulfúric (H ₂ SO ₄) Albúmina Sèrica Bovina (BSA) Diclohidrat de o-fenilendiamina (Sigmafast OPD™) P-nitrofenilfosfat (Sigmafast pNPP™) Tween-20 Tritó X-100 Deoxicolat sòdic Dodecil sulfat sòdic (SDS) Caseïna Sèrum fetal boví (FBS) Fibrinogen humà Albúmina humana sèrica
Panreac	Carbonat de sodi (Na ₂ CO ₃)
DAKO	Anticòs Policlonal IgG/Peroxidasa de rave (HRP) de conill Anticòs Anti-Humà IgG/Alcalina fosfatasa (AP) (H+L) Anticòs Anti-Humà IgA/AP (α-chain specific) Anticòs Anti-Humà IgM/AP (Fc _{5μ} fragment specific) IgG Calibrador Humà IgM Calibrador Humà IgA Calibrador Humà
Jackson ImmunoResearch	Anticòs Anti-Humà IgG/HRP de cabra (Fc _γ fragment Specific) Anticòs Anti-Humà IgA/HRP de cabra (α-chain specific) Anticòs Anti-Humà IgM/HRP de cabra (Fc _{5μ} fragment specific) Anticòs Anti-Humà IgA/HRP de conill (α-chain specific) Anticòs Anti-Humà IgM/HRP de conill (Fc _{5μ} fragment specific)
Carlo Erba	Clorur de sodi (NaCl) Hidròxid de sodi (NaOH)
Nunc	Plaques MaxiSorp™ Plaques F96 Amino Transparent Immobilizer™
Costar	DNA-Bind® Amine Binding N-oxysuccinimide Surface
BD Biosciences	3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina (Substrat TMB)
Corning	Portaobjectes (<i>slides</i>)
ArrayIt	Portaobjectes derivatitzats amb NHS-ester Tampó per la impressió de pèptids – Peptide Printing Buffer
Bio-Rad	Reactius pel test de Bradford – QuickStart™ Bradford Dye Reagent

Taula 5: Relació d'equips emprats durant la realització dels diferents experiments i marques/modelos corresponents.

Equip	Marca/Model
Pipetes semi-automàtiques	Gilson
Pipeta de repetició	Brand™ HandyStep™
Estufa	Selecta
Centrífuga	Digicen 20-R
Liofilitzadora	Christal-Alpha 2-4 LD Plus Freezer
Balança	Sartorius Analytic ACCULAB
Congelador -20°C	Liebherr
Congelador -80°C	Ing. Climas
HPLC	Agilent 1260 Infinity
Columnes HPLC semi-preparatives	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (9.4x250mm, particle size 5µm) Teknokroma Kromasil C-18 (10x250mm, particle size 5µm)
Columnes HPLC analítiques	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6x100, amb mida de partícula de 3,5µm)
UPLC-Ms	Waters Acquity UPLC – Waters LCT Premier XE
Columnes UPLC	Waters Acquity UPLC BEH C ₁₈ (2.1x100mm, particle size 1.7µm) Agilent Zorbax SB UHPLC C ₁₈ (2,1x150mm, particle size 1,8µm)
Bany ultrasons	Selecta
Rotavapor	Heidolph Laborota 40001 Efficient
Bany	Lauda AL-12
Equip aigua miliQ	Milipore
Fluorímetre	PTI QM4CW
pH-metre	Crison
Incubador	Memmert IN30
Microbalança analítica	Mettler Toledo XPR2
Rentador microplaques	Labtech LT3500
Lector microplaques	Labtech LT4500
Agitador magnètic	Agimatic-N Selecta
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Impressor de pèptids microarray	Microarrayer BioOdyssey™ Calligrapher
Lector Microarrays	Perkin Elmer ScanArray GX Plus
Puntes d'impressió microarrays	Arrayit
Adaptador per Slides de microarrays	Arrayit
Placa impressió microarrays	Arrayit
Espectròmetre RMN	Bruker 400

1. PREPARACIÓ DELS ANTÍGENS MODIFICATS POST-TRADUCCIONALMENT: PÈPTIDS SINTÈTICS I PROTEÏNES

Dins dels objectius transversals d'aquesta tesi doctoral s'inclouen la preparació de diferents tipus d'antígens (pèptids sintètics i proteïnes) que presenten modificacions post-traduccionals que poden tenir rellevància en el context de la resposta d'autoanticossos present en l'AR. Les modificacions post-traduccionals amb les que es treballarà són la citrul·lina, que afecta a l'aminoàcid arginina i la carbamilació/homocitrul·linació, acetilació i inducció de la formació d'adductes de MAA en l'aminoàcid lisina. Els processos que s'han dut a terme per l'obtenció dels diferents antígens es detallen a continuació:

1.1 Síntesi dels antígens peptídics amb diferents modificacions post-traduccionals

1.1.1 Síntesi de pèptids en fase sòlida

La síntesi química dels pèptids es va realitzar de forma manual, seguint la tècnica de síntesi en fase sòlida, prèviament descrita per Merrifield²⁰⁸. Aquesta tècnica es basa en l'ús d'un suport polimèric o resina insoluble sobre el qual es va donant l'addició consecutiva d'aminoàcids des de l'extrem C-terminal cap a l'N-terminal, fins a donar lloc a la cadena peptídica final desitjada. La cadena es manté unida a la resina durant tot el procés de síntesi.

Per poder assegurar que la síntesi peptídica es dona de manera lineal i sense ramificacions, els diferents aminoàcids estan protegits de forma ortogonal. Això significa que els grups protectors emprats en l'extrem α -amino s'eliminen en condicions químiques diferents que aquells emprats en la protecció de les cadenes laterals. Per la síntesi dels nostres pèptids, s'ha seguit l'estratègia de protecció ortogonal anomenada 9-fluorenilmetoxycarbonil/tert-butil (Fmoc/tBu). El grup Fmoc que protegeix l'extrem α -amino és làbil en condicions bàsiques mentre que els grups emprats en la protecció de les cadenes laterals ho són a condicions àcides.

Els aminoàcids protegits a l'extrem amino-terminal amb el grup Fmoc s'incorporen a la peptidil-resina amb el grup carboxil activat. Un cop format l'enllaç amida, el grup protector Fmoc s'elimina per tal d'incorporar el següent aminoàcid protegit amb Fmoc a la peptidil-resina. Les cadenes laterals es mantenen protegides fins l'últim pas, quan es realitza de forma simultània el desancoratge de la cadena del suport sòlid i l'eliminació dels grups laterals mitjançant el tractament en condicions àcides.

Al laboratori, aquest procediment es va realitzar de forma manual en reactors de 20mL que contenen un filtre de polietilè. Aquest filtre porós permet que la resina quedi retinguda durant tots els passos de la síntesi mentre els dissolvents i restes de reactius solubilitzats són filtrats i eliminats cap a un baló de residus amb l'ajuda d'un sistema de bomba de buit. Per poder efectuar de forma eficient els acoblaments i desproteccions durant la síntesi, les diferents reaccions es van agitant amb l'ajuda d'una vareta de tefló (Figura 11).

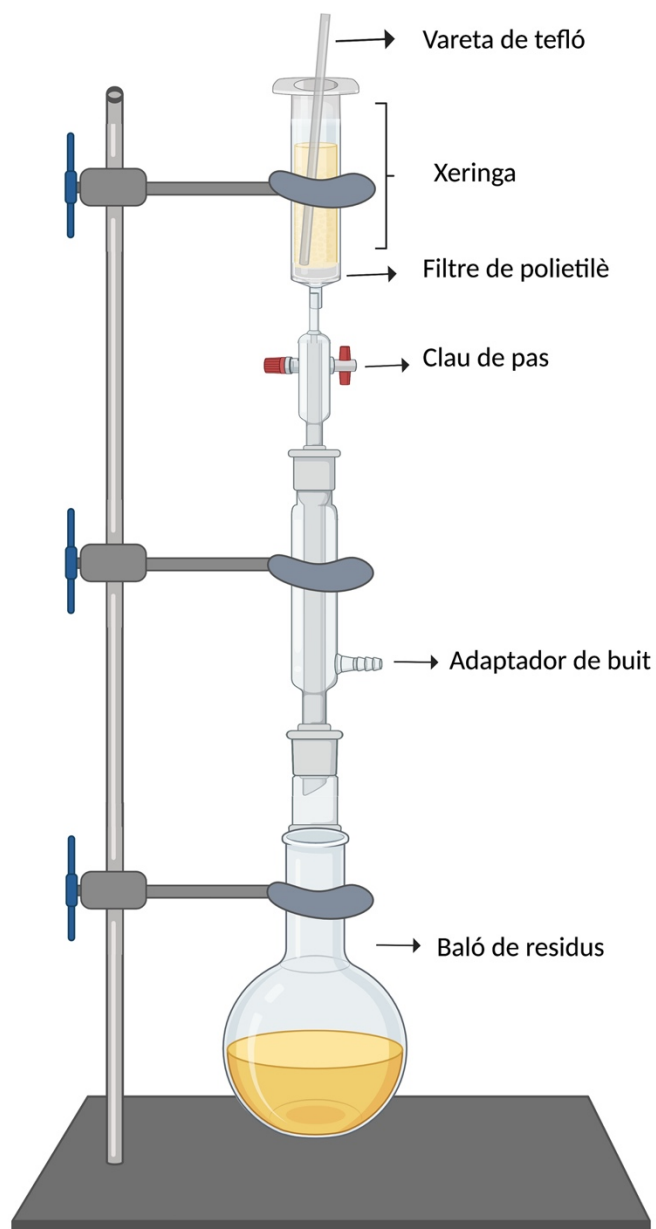


Figura 11: Muntatge emprat en la síntesi en fase sòlida de pèptids. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

L'esquema dels passos duts a terme en el procés de síntesi en fase sòlida es pot veure a la Figura 12.

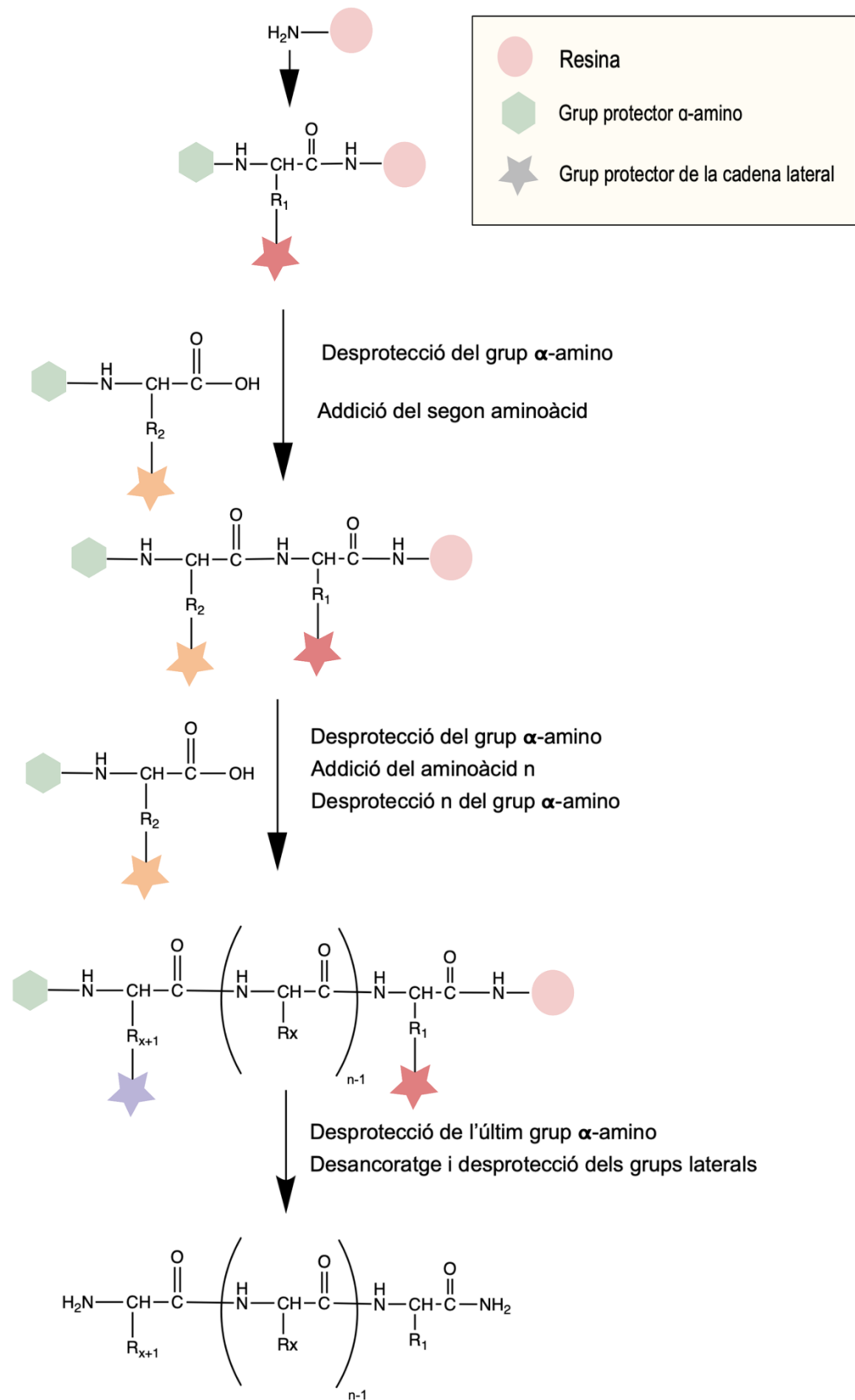


Figura 12: Esquema general del procediment de la síntesi en fase sòlida.

1.1.1.1 Suport sòlid

La síntesi en fase sòlida requereix d'un suport que sigui insoluble i inert en les condicions de treball en les que s'efectua la síntesi del pèptid. Aquest suport rep el nom de resina, i és un material amb una mida petita de partícula que afavoreix una correcta distribució i accés de tots els reactius emprats durant la síntesi peptídica. Es sol treballar amb polímers com el poliestirè, i com és en el cas de la resina emprada durant la nostra síntesi, es poden formar copolímers amb el polietilenglicol (PEG) (Figura 13).

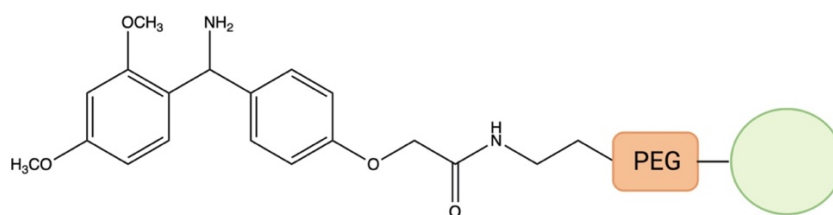


Figura 13: Esquema de la resina emprada, NovaSyn® TGR. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

En l'inici de la síntesi, el primer pas necessari és la solvatació de la resina, que consisteix en el tractament amb DMF durant un mínim 3 hores. Amb aquest tractament s'aconsegueix que hi hagi una màxima exposició dels grups que han de reaccionar i es garanteix que la resina està en condicions òptimes per la incorporació del primer aminoàcid. Una vegada inflada la resina, es filtra el DMF abans d'incorporar el primer aminoàcid dissolt per dur a terme l'acoblament.

1.1.1.2 Incorporació dels aminoàcids

La incorporació del primer aminoàcid es dona mitjançant la formació d'un enllaç amida entre l'àcid carboxílic activat del aminoàcid protegit amb Fmoc que s'incorpora i el grup α -amino desprotegit de l'aminoàcid unit a la resina. L'activació del grup carboxílic de l'aminoàcid protegit amb Fmoc es du a terme mitjançant el procediment experimental que consisteix en l'addició de l'aminoàcid dissolt (3 equivalents) en el mínim volum de DMF possible, juntament amb l'HATU (3 equivalents) i el DIEA (3 equivalents). Un cop introduït al reactor, es deixa reaccionar i es realitza agitació ocasional durant un període de 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'eliminen els excessos de reactius per filtració amb l'ajuda del buit i finalment es renta la resina amb DMF per acabar d'arrossegar possibles restes de la mescla aplicada presents en el reactor. Es fan 5 rentats d'un minut cadascun.

1.1.1.3 Desprotecció del grup Fmoc

Per tal de preparar la cadena peptídica amb la qual s'està treballant per l'acoblament del següent aminoàcid, s'ha d'eliminar el grup Fmoc que està protegint l'extrem α -amino de l'aminoàcid que ja s'ha afegit en la cadena peptídica. Per eliminar el grup Fmoc es treballa en condicions bàsiques – s'aplica a la resina un tractament amb piperidina al 20% en DMF que es manté durant 10 minuts a temperatura ambient. Per assegurar la desprotecció completa, es repeteix el procediment dues vegades mentre s'agita amb la vareta de tefló. Quan s'ha eliminat el grup Fmoc, es filtra la mostra i es tornen a fer 5 rentats d'1 minut amb DMF.

1.1.1.4 Identificació de la presència d'amines lliures

1.1.1.4.1 Test de Kaiser

De forma general, per determinar si l'acoblament i la desprotecció s'ha donat de manera correcta es treballa amb un test colorimètric anomenat **test de Kaiser o test de Ninhidrina**³⁴⁹. Es tracta d'un test basat en la detecció colorimètrica de les amines primàries lliures que ens permet determinar, gràcies al color, si s'ha donat de forma correcta l'acoblament i la desprotecció.

- **Preparació dels reactius del test**

Els reactius necessaris per efectuar la detecció colorimètrica són 3 i corresponen a les solucions descrites a continuació:

1. **Reactiu A:** Es prepara una dissolució calenta de fenol (80g) en etanol absolut (20mL).
2. **Reactiu B:** Paral·lelament es prepara una dissolució aquosa de cianur de potassi 0.001M, de la qual s'agafen 2mL i s'afegeixen a 98mL de piperidina.
3. **Reactiu C:** Es prepara una dissolució de ninhidrina (5g) en etanol absolut (100mL).

- **Procediment i resultats del test**

Per realitzar el test, s'utilitza un tub petit de vidre en el qual s'introdueix amb l'ajuda de l'espàtula unes quantes perles de la peptidil-resina que es vol analitzar i es renten amb etanol, que seguidament s'elimina. S'afegeixen 2 gotes de cadascun dels reactius preparats i s'agita suaument abans d'introduir al test a l'estufa, on es manté durant 3 minuts a 110°C. Paral·lelament, es fa també un test en un tub on no s'han afegit perles però sí els reactius per assegurar que el procediment s'està donant de forma correcta. Aquest test és un control que

haurà de donar sempre negatiu. Després de retirar els tubs de l'estufa, una coloració groguenca indicarà l'absència d'amines primàries lliures (test negatiu) mentre que la presència d'aquestes serà confirmada si s'obté una coloració blavosa (test positiu) (Figura 14).

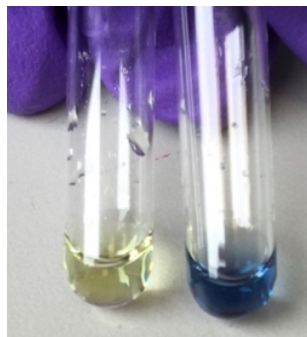


Figura 14: Resultats possibles del test de Kaiser. Exemple del resultat colorimètric obtingut amb un test negatiu (esquerra) i un test positiu (dreta).

Així doncs, en el cas d'estar comprovant si l'acoblament s'ha donat de manera correcta, les amines primàries hauran d'estar protegides per un grup Fmoc i haurem de trobar un test negatiu mentre que en el cas contrari, després de l'eliminació del Fmoc, el resultat del test ha de ser positiu. Cal remarcar que hi ha alguns aminoàcids que no acaben de donar la coloració blavosa en cas de la presència d'amines primàries lliures i en algunes ocasions observem una coloració més aviat vermellosa.

1.1.1.4.2 Test de Cloranil

En el cas d'aminoàcids com la prolina, on el grup α -amino no és primari, el test que es du a terme està encarat a detectar amines secundàries. En aquest cas la detecció es fa mitjançant el test de cloranil.

- **Preparació dels reactius del test**

En aquest assaig, el reactiu emprat és una solució saturada (75mg) de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranil) en toluè (25mL).

- **Procediment i resultats del test**

El procediment del test es dona de forma similar a l'anteriorment descrit. Es necessiten unes perles de la peptidil-resina sobre la qual s'apliquen 5 gotes del reactiu de cloranil i 1 gota d'acetona i s'agita. En aquest cas, però, el resultat del test s'obté un cop passats 5 minuts a

temperatura ambient. Una coloració groga o incolora de les perles indica una absència d'amines secundàries lliures (test negatiu) mentre que una coloració blavosa de les perles indica la presència d'amines secundàries lliures (test positiu) (Figura 15).

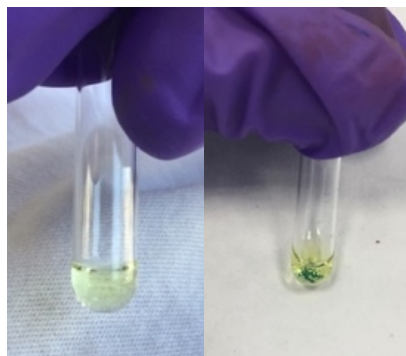


Figura 15: Resultats possibles del test de cloranil. Exemple del resultat colorimètric obtingut amb un test negatiu amb perles transparents (esquerra) i un test positiu amb perles clarament blaves (dreta).

1.1.2 Modificacions de la peptidil-resina

Una vegada finalitzada la síntesi de la cadena peptídica desitjada és possible dur a terme una àmplia quantitat de modificacions en la peptidil-resina, com l'addició de fluorocroms o àcids grassos entre d'altres. En el nostre cas, i amb la finalitat de poder unir els pèptids a un suport sòlid, es van biotinilar algunes de les estructures peptídiques. La biotinilació es va efectuar mitjançant l'addició d'un grup N-biotinil-NH-(PEG)₂-COOH a l'extrem α -amino de l'últim aminoàcid de la cadena ja desprotegit.

El procediment per poder incorporar la biotina a la peptidil-resina consisteix en pesar 4 equivalents de N-biotinil-NH-(PEG)₂-COOH i diluir-los en el volum mínim de DMF. Per induir l'acoblament d'aquest grup s'activa l'àcid carboxílic mitjançant el següent procediment experimental: es pesen també 4 equivalents de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) i Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfoni (PyBOP) i de 8 equivalents de N,N'-Diisopropiletilamina (DIEA). La reacció es deixa durant tota la nit i a l'endemà es fan 5 rentats amb DMF, com en el procediment de tots els acoblaments. Es determina el seu correcte acoblament mitjançant el test de Ninhidrina.

1.1.3 Tractament final i assecat de la peptidil-resina

Un cop acabada la síntesi de la cadena peptídica desitjada i assegurada la correcta desprotecció de l'últim grup Fmoc present de l'extrem α -amino, i com a pas previ al desancoratge, caldrà fer el procediment d'assecat de la resina per eliminar el DMF que hagi pogut quedar retingut i que

interferiria en el tractament requerit per separar el pèptid de la resina. Per evitar la presència de DMF i d'altres restes de reactius que puguin interferir, es duen a terme una sèrie de rentats com els que s'indiquen a la Taula 6. Un cop seca la resina, es deixa al buit al dessecador fins que el pes sigui constant.

<i>Etapa</i>	Reactiu	Finalitat	Temps (minuts i repeticions)
1	Àcid acètic	Rentat	1 minut, 2 repeticions
2	Diclorometà	Rentat	1 minut, 2 repeticions
3	Metanol	Assecat	1 minut, 2 repeticions
4	Dietilèter	Assecat	1 minut, 2 repeticions

Taula 6: Etapes de rentat i per assecatge de la peptidil-resina després de la síntesi.

1.1.4 Desancoratge del pèptid de la resina

La separació física del pèptid i la resina suposa l'últim pas en el procés de la síntesi en fase sòlida. Durant aquest pas, i degut a les condicions experimentals en les que es treballa, s'aconsegueix simultàniament la separació del pèptid del suport polimèric i l'eliminació dels grups laterals dels aminoàcids que fins ara estaven encara units als aminoàcids. Per dur a terme aquest pas, es treballa en un medi àcid.

Es prepara un "còctel" que està compost per àcid trifluoroacètic (TFA) en presència de capturadors de carbocacions com el triisopropilsilà (TIS) i aigua en una relació de 95:2,5:2,5. Aquesta barreja s'aplica al reactor que conté la peptidil-resina i es deixa reaccionar durant 5 hores. Un cop passat aquest temps, es filtra la resina i en aquest cas, es recull el pèptid en dissolució en un tub de polietilè de 50mL. El volum de còctel necessari es determina en funció de la quantitat de peptidil-resina amb la qual es treballa.

Per tal d'aïllar el pèptid obtingut, s'evapora el TFA amb ajuda d'un corrent de N₂ fins a reduir el volum final al màxim. Posteriorment, s'afegeix dietilèter fred per provocar la precipitació del pèptid. La barreja del pèptid es centrifuga a 4500rpm durant 10 minuts i finalment se n'elimina el sobrenedant. Aquest procediment de rentat amb dietilèter es repeteix fins a 5 vegades. Acabats els rentats, el pèptid precipitat es torna a dissoldre en una dissolució aquosa al 10% d'àcid acètic, es congela i es liofilitza per obtenir el pèptid cru.

1.2 Cicllació dels pèptids

En gran part dels pèptids d'estudi inclosos en la tesi s'ha treballat en la seva forma cíclica. Això significa que s'ha induït la formació d'un punt disulfur entre dos grups tiol presents en l'estructura del pèptid (Figura 16). A nivell de disseny de les estructures peptídiques, la tècnica que s'ha seguit per poder induir aquest procés de forma controlada ha estat la introducció de dues cisteïnes en posicions on, en la proteïna nativa, hi havia presència de residus serina (degut a la similitud estructural dels aminoàcids). Aquests residus han estat substituïts per cisteïnes protegides amb un grup protector a la cadena lateral anomenat acetamidometil (Acm). Aquest grup no és làbil a medi àcid i es manté unit a l'aminoàcid fins i tot durant el procés de desancoratge, fins que es du a terme la ciclació.

El procés experimental de ciclació dels pèptids ha consistit en la inducció del pont disulfur mitjançant el tractament del pèptid cru encara protegit amb Acm. En primer lloc es solubilitza el pèptid cru en una solució d'àcid acètic/aigua (1:1) a una concentració d'1mg/mL sota un corrent de nitrogen. Després de 20 minuts, s'afegeix HCl 1M a una concentració de 0,1M i el volum que es correspon a 20equivalents/molècula d'Acm de 0,1M de Iode (I_2). La reacció es torna a deixar sota corrent de nitrogen per generar atmosfera inerta fins que es retira el corrent i es manté aquesta atmosfera amb ajuda d'un globus. Després de 4 hores en agitació, s'afegeixen unes gotes d'àcid ascòrbic 1M fins que la dilució es torna totalment transparent. Finalment, la mostra es concentra i evapora sota pressió reduïda fins aproximadament obtenir 1/3 del volum inicial. En aquest moment, està a punt per començar la purificació del pèptid cru ciclats.

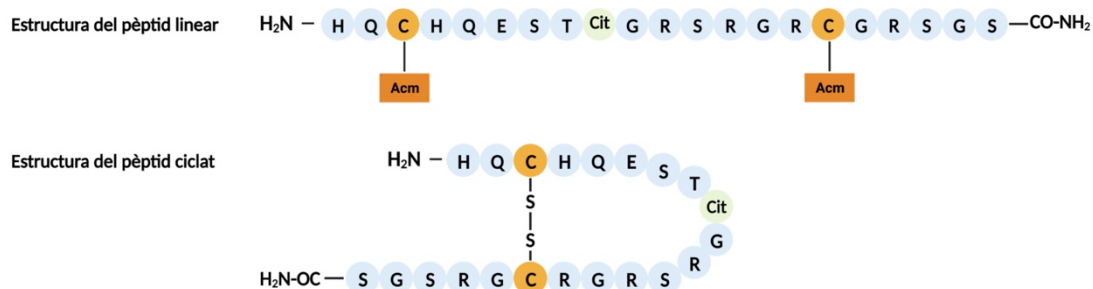


Figura 16: Exemple de la ciclació en una estructura peptídica derivada de la flagrina. Es mostra com en la estructura del pèptid en la seva forma lineal, tal i com s'obté després de l'escissió de la resina, les cisteïnes estan protegides amb un grup Acm. Un cop s'ha donat la ciclació del pèptid, el grup protector s'ha eliminat per donar lloc a la formació d'un pont disulfur entre les dues cisteïnes de la seqüència. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

1.3 Purificació dels pèptids

El procés de purificació dels pèptids es va dur a terme mitjançant HPLC a escala semi-preparativa amb les columnes C18 indicades a la taula 5. El flux emprat va ser de 2,5mL/min i es va treballar amb gradients lineals de dos dissolvents, el dissolvent A (H₂O + 0,05% de TFA) i el dissolvent B (ACN + 0,05% de TFA). Per purificar els pèptids no biotinilats que s'han inclòs en aquesta tesi es va emprar un gradient de 0 al 25% de B en un temps de 20 minuts. En el cas dels pèptids biotinilats el gradient va ser de 5-95% de B en el mateix temps. La detecció es va realitzar a 220nm i les diferents fraccions recollides pel col·lector van ser liofilitzades i posteriorment caracteritzades.

1.4 Caracterització dels pèptids

La caracterització de les diferents molècules peptídiques es va dur a terme per HPLC a escala analítica i també per espectrometria de masses.

1.4.1 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) a escala analítica

Es van fer servir les columnes C₁₈ de fase indicades a la taula 5. Els pèptids es van analitzar a un flux d'1mL/min amb un gradient lineal de 0-25% de B en 20 minuts o de 5-95% de B en 20 minuts en el cas dels pèptids biotinilats. La detecció es va dur a terme a 220nm.

1.4.2 Espectrometria de masses

La predicció de les relacions de m/z esperades de cada pèptid analitzat es va dur a terme gràcies a diferents eines informàtiques. En primer lloc es va dibuixar la fórmula química de cada pèptid amb el software editor de molècules ChemDraw. La introducció d'aquesta fórmula química al software MassLynx V4.1 va permetre l'obtenció dels pics m/z necessaris per la identificació. A nivell experimental els diferents pèptids es van analitzar en un espectròmetre de masses electrospray acoblat a un cromatògraf d'ultra resolució.

Els pèptids sense biotinar van ser caracteritzats mitjançant la tècnica FIA (*flow-injection analysis*) en un cromatògraf d'ultra resolució UPLC Acquity amb un detector d'UV en sèrie acoblat a un detector líquid-masses electrospray (ESI-MS). Els pèptids biotinilats es van analitzar en el mateix equip però es van cromatografiar en la columna de fase reversa indicada en la taula 5. Els pèptids es van eluir a un flux de 0,3mL en un gradient lineal de 10%-100% de l'eluent B. L'eluent A

emprat va ser H₂O + 20mM d'HCOOH i el B va ser ACN + 20mM d'HCOOH. Les relacions m/z obtingudes es van comparar amb les teòriques esperades per identificar cadascun dels pèptids.

Els pèptids purificats i caracteritzats es van emmagatzemar en forma d'alíquotes de 0,1mg al congelador a -20°C per ser utilitzades en les diferents anàlisis posteriors.

1.4.3 Càlcul del rendiment de la síntesi dels pèptids

De forma general, es va dur a terme el càlcul de tres rendiments diferents:

- a) **Rendiment d'escissió:** Fa referència a l'eficiència del tractament acidolític amb el qual es dona l'escissió del pèptid de la matriu polimèrica insoluble. Es calcula mitjançant la quantificació del cru peptídic obtingut pesant la mostra liofilitzada en relació al valor teòric de pèptid cru calculat en funció de la funcionalització final de la resina.

- b) **Rendiment de purificació/ciclació + purificació:** Fa referència a l'eficiència del procés de purificació. En la majoria dels pèptids inclosos a la tesi, es dur a terme la ciclació com a pas previ a la seva purificació. Donat que la purificació dels pèptids cíclics es dona immediatament després de la ciclació, es fa el càlcul combinat dels dos processos de forma simultània. Es calcula determinant la quantitat de pèptid pur obtingut per pesatge respecte el valor de cru peptídic del qual s'ha partit.

- c) **Rendiment global de síntesi:** Fa referència al valor global de l'eficiència d'obtenció del pèptid. És el producte dels rendiments d'escissió i purificació.

2. PREPARACIÓ DELS ANTÍGENS PROTEICS

2.1. Proteïnes carbamilades

2.1.1. Preparació de les proteïnes carbamilades

Per poder realitzar l'estudi de la presència d'anti-CarP es va treballar en la modificació de dos antígens proteics diferents: sèrum fetal boví (FCS), àmpliament descrit com el *gold-standard* a nivell experimental per la detecció d'aquest tipus d'autoanticossos en l'AR, i fibrinogen. Els dos antígens es van adquirir sense modificar i van ser tractats posteriorment. El procediment de carbamilació emprat en els dos antígens és el descrit per *Shi et al*⁸⁰, amb petites modificacions i es va realitzar tal i com es descriu a continuació.

El FCS va ser diluït en H₂O a una concentració de 4mg/mL a la qual es va afegir cianat de potassi (KOCN) a una concentració d'1M. Es va incubar durant 12 hores a 37°C i posteriorment es va concentrar mitjançant centrifugació amb filtres Amicon de 3kDa. En el cas del fibrinogen, es va dur a terme el mateix procediment però la concentració inicial va estar de 5mg/mL i la concentració del KOCN emprada va ser de 0,5M. El temps d'incubació es va estendre durant 3 dies a 4°C. La recuperació i concentració de la mostra es va realitzar de forma anàloga al FCS.

2.1.2. Caracterització de les proteïnes carbamilades

Per determinar la correcta carbamilació de la mostra es va dur a terme un estudi de l'anàlisi d'aminoàcids en les dues mostres – la mostra carbamilada i la mostra control per cada proteïna d'assaig. Aquesta tècnica consisteix en la hidròlisi àcida de la mostra a analitzar i la posterior anàlisi dels residus (aminoàcids) generats mitjançant cromatografia. Aquesta anàlisi va ser duta a terme per la Unitat de Tècniques Separatives i Síntesi de Pèptids del Parc Científic de Barcelona. L'anàlisi es va dur a terme en un equip analitzador d'aminoàcids Biochrom 30. El canvi de lisina a homocitrul·lina es va determinar com a fracció de la quantitat total d'aa i es va incloure de forma estàndard intern de referència de l'anàlisi un patró d'aa que conté L-norleucina i àcid α -aminobutíric.

2.2. Proteïnes amb adductes de malondialdehid-acetaldehid (MAA)

La determinació d'anticossos contra adductes de MAA (proteïnes-MAA) es va realitzar seguint el protocol descrit per *Thiele et al*¹⁶¹. Inicialment es va dur a terme la modificació de l'albumina humana sèrica (HSA), tal i com s'havia descrit a l'assaig publicat de referència. Com a part dels nous assaigs inclosos en aquesta tesi, es va dur a terme també l'assaig emprant un antigen proteic diferent, el fibrinogen. Finalment també es va incloure un antigen peptídic, sintetitzat manualment al laboratori. El pèptid que es va emprar com a base per la seva posterior modificació és la forma nativa (control) d'un pèptid quimèric de fibrina/filagrina en la seva forma cíclica i rep el nom de CFFCP-R. Es va partir d'aquesta estructura amb una puresa mínima del 95% i ciclada per la inducció de la formació dels adductes de MAA en els dos residus de lisina presents en la seqüència.

2.2.1. Inducció de la formació d'adductes de MAA

La modificació dels diferents antígens es va dur a terme en dos passos. En primer lloc es va obtenir el malondialdehid en forma de sal de sodi seguint el protocol descrit per *Kikugawa et al*³⁵⁰, amb la introducció de petites modificacions. En un matràs es van afegir 5mL de 1,1,3,3-tetrametoxipropà i sobre aquest volum es van anar afegint lentament 2,5mL d'àcid clorhídric (HCl) 1M. Es va tancar el matràs i es va segellar amb parafilm. Es va deixar en lleu agitació durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació, es va deixar refredar durant 15 minuts en gel abans d'ajustar el seu pH a 10 mitjançant l'addició de gotes d'hidròxid de sodi (NaOH) 6M. El canvi del pH es va monitoritzar amb l'ajuda de tires reactives de pH. Posteriorment es va precipitar el malondialdehid mitjançant l'addició de 100mL d'acetona freda i deixant posteriorment refredar la mescla durant 1 hora en gel. Es va filtrar la mostra amb l'ajuda de paper de filtre i es van obtenir els cristalls de malondialdehid, que es van mantenir a -20°C durant 1h 30 minuts com a pas previ de la seva purificació per recristal·lització amb aigua/acetona (1:1, v/v). La sal de sodi de malondialdehid (MDA-Na) purificada es va deixar reposar durant 24 hores en un dessecador protegit de la llum per eliminar la humitat restant i passat aquest període de temps, es va emmagatzemar a -20°C protegit de la llum.

Finalment, i ja per induir la formació d'adductes de MAA, tant les proteïnes com el pèptid CFFCP-R es van dissoldre a una concentració de 2mg/mL i es van incubar amb 3mM de malondialdehid i 1,5mM d'acetaldehid (relació molar 2:1) en tampó fosfat 0,1M pH 7,2 durant 72 hores a 37°C, en tubs d'1,5mL de polipropilè protegits de la llum i segellats amb *parafilm*. De forma paral·lela

es van incubar els mateixos antígens en condicions idèntiques però en absència del malondialdehid i acetaldehid per obtenir la versió sense modificar. Aquesta versió va servir com a control en els posteriors assaigs.

Passat el temps de reacció, el procediment seguit va ser diferent per les proteïnes que pel pèptid. Les proteïnes van ser dialitzades en tampó fosfat 0,1M a pH 7,2 durant 24 hores a 4°C amb 3 canvis de tampó amb l'objectiu d'eliminar de la mostra les restes dels aldehids que havien quedat sense reaccionar. Després de la diàlisi, les proteïnes es van conservar a -20°C tapades per ser caracteritzades i conservades pel seu ús en els posteriors immunoassaigs. La quantificació de la proteïna es va dur a terme mitjançant el mètode de Bradford amb el kit comercial QuickStart™ Bradford, que inclou una recta de calibratge d'albumina sèrica bovina com a referència. En el cas dels pèptids, el procediment seguit va ser la centrifugació amb filtres Amicon de 3kDa per tal de poder eliminar les restes dels aldehids alhora que es reté el pèptid i es concentra per la seva posterior caracterització i conservació.

2.2.2. Caracterització dels canvis induïts en els antígens proteics/peptídic

La verificació de la formació d'adductes de MAA en les proteïnes i el pèptid es va donar mitjançant un assaig de fluorescència d'acord a l'emissió del nou adducte format a una longitud d'ona determinada. La formació d'adductes de MAA es va verificar mitjançant l'anàlisi de l'espectre d'emissió de fluorescència de les diferents mostres.

Per poder quantificar la formació d'adductes de MAA, es va treballar en la producció d'un estàndard, l'1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldehid, que es va anomenar hexil-MAA. Aquest estàndard és un anàleg estructural del compost majoritari present en les proteïnes modificades després de la formació dels adductes de MAA en les lisines. La síntesi química es va fer seguint el protocol de Xu et al ¹⁶⁵. El procediment es descriu a continuació.

En un matràs de fons rodó es van afegir 2,13mL de MDA-Na 1M i 0,23mL d'hexilamina i es va ajustar a pH 4 mitjançant l'addició gota a gota d'HCl 12M. Finalment es van afegir $5,98 \cdot 10^{-2}$ mL d'acetaldehid. La reacció es va mantenir en agitació a 50°C durant 4 hores. Acabat aquest període, es va confirmar la presència de l'estàndard mitjançant una cromatografia en capa fina que en va permetre determinar el valor de fronts, que en aquest cas concret, segons les referències seguides, presentava un valor (Fr) de 0,73 ¹⁶⁵.

Posteriorment es va dur a terme la purificació de l'estàndard hexil-MAA per cromatografia en columna. La cromatografia es va realitzar en una columna petita empaquetada amb gel de sílice de 200-400mesh 60Å i com eluent es va fer servir un gradient per passos continu d'hexà:acetal d'etil (100 d'hexà fins al 20:80 d'hexà:acetal d'etil). Per introduir el gradient en la columna, es van anar afegint i eluint fraccions de forma consecutiva d'hexà:acetal d'etil amb una variació de la relació del 2% entre els dos eluents. Es van recollir les diferents fraccions, que presentaven una visible coloració groguenca, des de la relació 42:58 fins a la 32:68. Cadascuna d'aquestes fraccions es va analitzar mitjançant cromatografia en capa fina (TLC, de l'anglès *thin layer chromatography*) com a pas previ a ajuntar-les per poder fer-ne la caracterització. Les fraccions obtingudes es van liofilitzar i emmagatzemar com a sòlid protegit de la llum a -20°C.

La caracterització de l'hexil-MAA es va realitzar mitjançant ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN). Es van dissoldre 5mg d'hexil-MAA en cloroform deuterat i se'n va registrar l'espectre a 400MHz a l'equip disponible a l'IQAC-CSIC. Es va utilitzar el tetrametilsilà com a estàndard de referència per la comparació dels valors de δ (TMS; $\delta = 0,0$). Un cop confirmada la identitat del compost, va ser inclòs com a estàndard en l'assaig per la determinació de la formació dels adductes de MAA en les proteïnes d'anàlisi.

Aquest assaig es va dur a terme seguint un protocol ja descrit i que es descriu breument a continuació. Es va dissoldre l'hexil-MAA a una concentració de stock de 1,67mg/mL en tampó fosfat 0,1M pH 7,2 a partir de la qual es va preparar una corba estàndard de dilucions seriades (1:2). En una placa Nunc de 96 pous negra es van afegir per duplicat 50 μ L de cadascuna de les dilucions preparades de la corba així com 50 μ L de les proteïnes d'anàlisi (HSA-MAA, el Fibrinogen-MAA, HSA-Control i Fibrinogen-Control) a una concentració d'1mg/mL. En un lector de microplaques híbrid (Taula 5) es va comprovar que l'absorbància a 470nm de tots els pous era inferior a 0,1. Seguidament es van excitar les mostres a una longitud d'ona de 398nm, d'acord als valors publicats en la bibliografia i es va recollir l'espectre d'emissió entre 360 i 600nm per determinar-ne el pic màxim d'emissió. Aquest es va donar a 460nm, valor coincident amb l'obtingut en els assajos de referència.

A continuació es va mesurar la fluorescència dels diferents punts de la corba estàndard i de les proteïnes tant modificades com control a la longitud d'ona de màxima emissió en unitats de fluorescència relativa (RFU). Per determinar la quantitat de molècules fluorescents formades a cada proteïna es va fer servir l'equació següent:

$$Uni\acute{o} fluorescent = \frac{F \frac{398nm}{\lambda \text{ màx. emissió}} (RFU)}{k \left(\frac{RFU}{nmol \times L^{-1}} \right)} \cdot \frac{\text{Factor dilució proteïna}}{c \left(\frac{mg}{L} \right)}$$

Equació 1: Determinació de la concentració de MAA fluorescent expressada en nmols de MAA per mg de proteïna. La k representa una constant amb un valor obtingut de la pendent de la recta construïda amb la regressió lineal de la representació gràfica dels valors d'intensitat de fluorescència (RFU) a 460nm de les diferents concentracions de la corba estàndard del hexil-MAA en nmols/L. $F_{398/\lambda \text{ màx. emissió}}$ és la intensitat de fluorescència emesa (RFU) a la longitud d'ona d'excitació (398nm) i la longitud d'ona de màxima emissió (460nm) i c és la concentració de la proteïna en la mostra en el moment de la mesura.

Un cop calculada la unió fluorescent, el ratio de modificació o adducció de proteïna es calcula mitjançant l'equació 2. Aquest ratio és un valor i ha de ser superior a 1 si la proteïna s'ha modificat correctament.

$$Ratio \frac{F}{M} = \frac{Uni\acute{o} fluorescent \left(\frac{nmols}{mg} \right)}{Proteïna \left(\frac{nmols}{mg} \right)}$$

Equació 2: Determinació del ratio de proteïna que ha patit la modificació estructural analitzada, és a dir, la formació d'adductes de MAA en les seves lisines.

3. IMMUNOASSAIGS PER LA DETERMINACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA ELS DIFERENTS ANTÍGENS AMB MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS

La determinació d'AMPAs emprant pèptids com antígens ha servit per la detecció d'anticossos de diferents famílies. S'han fet servir dos tipus d'assaig per tal de dur a terme aquesta detecció, en funció del tipus de suport emprat – els microarrays peptídics o bé mitjançant ELISA. A més, dins els assajos immunoenzimàtics ELISA realitzats, s'han anat fent modificacions de protocol en funció de l'antigen emprat i les necessitats d'optimització en cada situació. A continuació s'expliquen en detall els diferents protocols emprats per l'optimització i realització dels immunoassaigs. En primer lloc s'esmenten alguns dels factors comuns per la determinació d'anticossos en totes les plataformes i antígens.

3.1. Factors comuns dels diferents immunoassaigs

Durant els diferents immunoassaigs duts a terme com a part d'aquesta Tesi, s'ha mantingut en comú la estructura de l'immunoassaig i els diferents passos que s'han dut a terme per poder determinar la presència dels anticossos de les diferents famílies. Tots els assaigs s'han basat en els passos clàssics d'un ELISA indirecte (Figura 18) i la principal diferència entre els dos suports emprats (ELISA vs microarray) ha estat l'anticòs secundari emprat per revelar el resultat final. En el cas de l'ELISA s'ha treballat amb un anticòs secundari conjugat a un enzim per dur a terme la quantificació dels anticossos mentre que en el format microarray l'anticòs secundari estava conjugat a un fluoròfor que ha servit per determinar de forma directa la intensitat de la resposta (Figura 17).

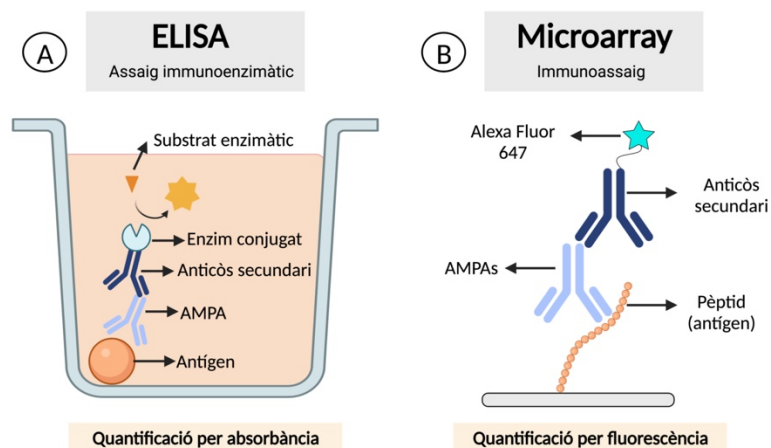


Figura 17: Comparació de la visió general del tipus d'assaig que es dona en (A) un format ELISA vs (B) un format microarray. En el primer es requereix l'ús d'enzims conjugats a l'anticòs secundari i l'addició del seu substrat per dur a terme la quantificació mentre que en el microarray es du a terme mitjançant la lectura directa de la intensitat de fluorescència emesa pel fluorocrom unit a l'anticòs secundari. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

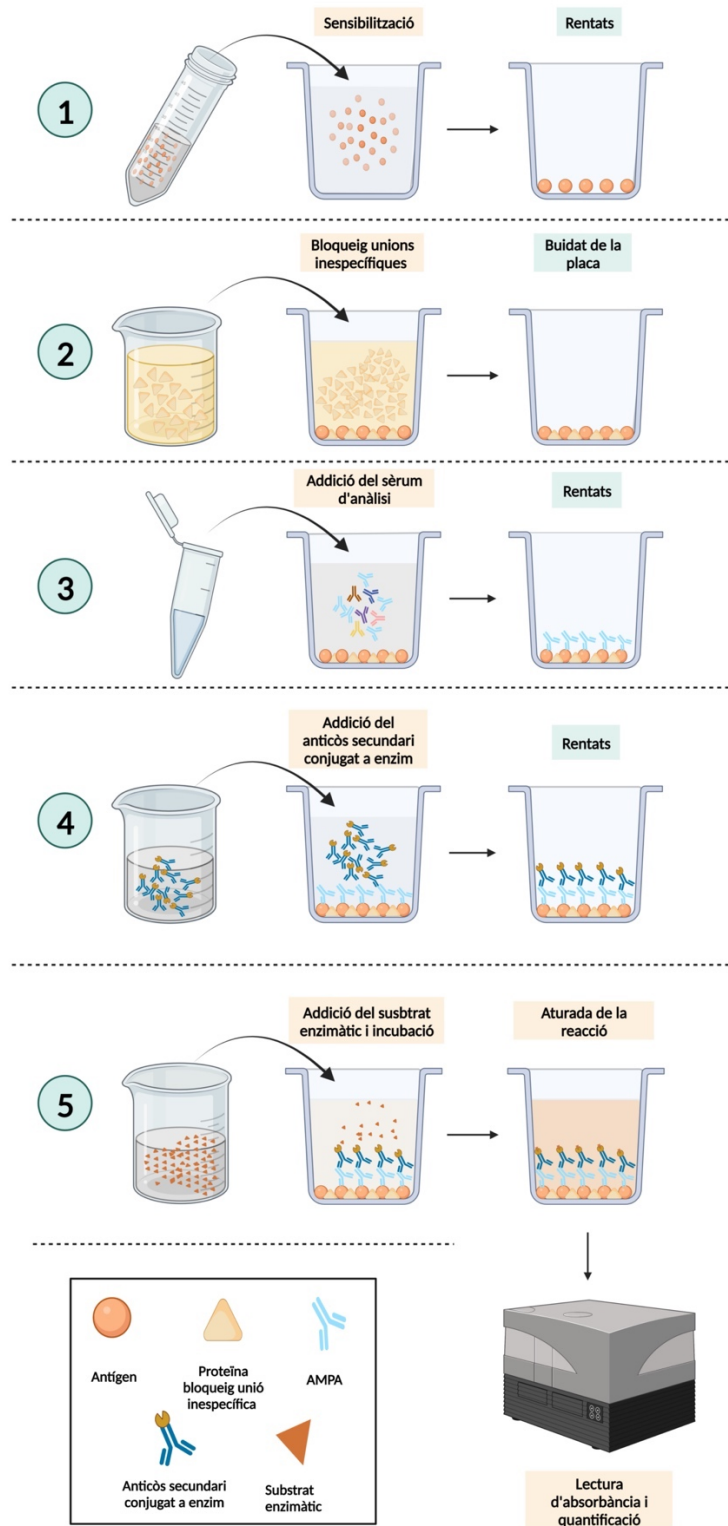


Figura 18: Esquema dels passos d'un assaig ELISA indirecte. El procés comença amb la sensibilització de les plaques amb l'antigen (1) i es segueix amb el bloqueig de les unions inespecífiques (2) abans de l'aplicació dels sèrums d'anàlisi (3). La determinació s'acaba amb la incorporació de l'anticòs secundari conjugat a l'enzim (4) per dur a terme la quantificació en presència del substrat que s'incorpora a l'últim pas (5). Finalment, s'atura la reacció i es fa la lectura d'absorbància. Imatge d'autoria pròpia realitzada amb BioRender.com.

Un altre punt en comú dels diferents assaigs duts a terme són les diferents solucions tamponades que s'han fet servir en els diferents passos de l'assaig esmentats en la Figura 18. De forma resumida, s'exposen a continuació (Taula 7):

Pas	Nom del tampó	Composició del tampó
Rentats	Fosfat salí – Tween 20 (PBS-T)	Tampó 0,1M pH 7,5 que conté les següents sals - NaCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ i KCl dissoltes en aigua miliQ. Tampó suplementat amb 0,05% de Tween-20 (v/v).
Sensibilització (1)	Carbonat/Bicarbonat	Tampó 0,05M de Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ en aigua miliQ a pH 9,6.
	Fosfat salí (PBS)	Tampó 0,1M pH 7,5 que conté les següents sals - NaCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ i KCl dissoltes en aigua miliQ.
Bloqueig interaccions inespecífiques (2)	Carbonat/Bicarbonat + 2% de BSA	Tampó 0,05M de Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ en aigua miliQ a pH 9,6, suplementat amb un 2% de BSA.
	Caseïna al 2% de BSA + PBS-T	Tampó amb 2% de caseïna en aigua miliQ. Per la preparació es treballa amb 20g de caseïna dissolts en 900mL i 2,5mL de NaOH. Es suplementa amb 100mL de PBS-T 1M. Ajustat a pH 7,2.
	PBS-T + 1% de BSA	Tampó PBS-T suplementat amb un 1% de BSA.
Dilució mostres i anticòs secundari (3 i 4)	RIA	Tampó que consta de 0,35M NaCl, 0,01M TRIS, 1% BSA, 0,5% de deoxicolat sòdic (v/v), 0,1% de SDS (v/v), 1% Tritó X-100 (v/v) en aigua miliQ. El tampó es suplementa, just abans del seu ús, amb 10% de sèrum fetal boví (FBS).
	0,5% Caseïna + PBS-T	Tampó preparat a partir del Tampó de Caseïna al 2% amb PBS-T. Es prepara un volum final amb el 25% de Tampó Caseïna al 2% + PBS-T i s'afegeix el 75% de volum PBS-T 0,1M.
	PBS-T + 1% BSA	Tampó PBS-T suplementat amb un 1% de BSA.
Revelat i quantificació (5)	SigmaFast™ OPD	Preparat comercial de la casa Sigma en forma de pastilles de diclorhidrat de o-fenilendiamina i de peròxid d'hidrogen. Quan cada pastilla es dissol en 20mL d'aigua s'obtenen concentracions finals de 0.4mg/mL de cadascun dels compostos en tampó fosfat-citrat 0,05M pH 5.
	SigmaFast™ P-nitrofenilfosfat	Preparat comercial de la casa Sigma en forma de p-nitrofenilfosfat i de tampó Tris en forma de pastilles. Quan cada pastilla es dissol en 20mL d'aigua s'obtenen concentracions finals de 1mg/mL de pNPP en tampó TRIS 0,2M.
	Set de substrats TMB	Es tracta d'un kit comercial per la detecció de peroxidasa que es basa en dos reactius diferents. El substrat reactiu A és una solució de peròxid d'hidrogen i el substrat reactiu B és una solució de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en solvent orgànic.
Solució d'aturada (5)	H₂SO₄	Es tracta d'una solució àcida d'H ₂ SO ₄ 2N.
	NaOH	Es tracta d'una solució bàsica de NaOH 3N

Taula 7: Relació dels passos d'ELISA (numeració d'acord als passos explicats a la Figura 18) i els tampons emprats en cadascun. S'especifica el nom del tampó i la seva composició. En alguns dels passos s'indiquen diferents passos ja que l'elecció del tampó va en funció de l'immunoassaig determinat.

3.2. ELISA

Durant la realització de la tesi s'han realitzat diferents determinacions de la presència d'autoanticossos relacionats amb diferents modificacions post-traduccionals. En aquests assaigs s'ha treballat amb diferents tipus d'antígens: pèptids, pèptids biotinilats i proteïnes. En funció del tipus d'antigen, els passos de l'immunoassaig difereixen lleugerament, així com el mecanisme d'unió a la placa. A continuació es descriuen els diferents tipus d'unió i protocols que s'han dut a terme per tots els diferents antígens. Al final de l'apartat 3.2 s'inclou una taula resum on s'expliquen tots els passos, condicions i reactius emprats en l'assaig ELISA en funció del tipus d'antigen presentat (Taula 8).

3.2.1. Determinació d'AMPAs contra pèptids modificats post-traduccionament sense biotinilar

En el cas dels pèptids sense biotinilar, es va treballar amb plaques derivatitzades comercialment per poder unir molècules que presenten grups amino lliures com és el cas els pèptids. Es van emprar diferents tipus de plaques provinents de diverses cases comercials. A continuació es descriu el mètode d'unió dels pèptids en cada cas.

3.2.1.1. Assaigs amb plaques Costar DNA-Bind amb superfície N-oxisuccinimida

Per l'assaig del treball inclòs en el primer apartat de la tesi, on s'analitza la resposta ACPA en front d'una sèrie de pèptids quimèrics citrul·linats, es va treballar amb plaques comercials Costar DNA-Bind. Aquest tipus de plaques comercials estan derivatitzades i presenten a la superfície N-oxisuccinimida, que pot reaccionar amb les molècules que presenten grups amina, en aquest cas els pèptids pel seu extrem N-terminal o per les cadenes laterals dels aminoàcids lisina o arginina, i formar enllaços covalents (Figura 19).

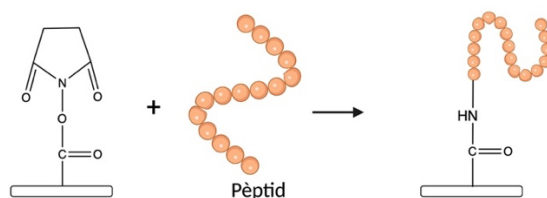


Figura 19: Esquema representatiu de la unió del pèptid a plaques derivatitzades amb N-oxisuccinimida.
Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

El seguit de passos del protocol de l'immunoassaig emprat en aquest tipus de plaques es descriu a continuació. En primer lloc, els pèptids es van dissoldre en tampó carbonat/bicarbonat 0,05M pH=9,6 a una concentració de 10µg/mL. Es van aplicar 100µL de la solució del pèptid a cada pouet i es va deixar incubar tota la nit a 4°C. En les diferents plaques es van incloure pous control amb tots els reactius excepte el sèrum d'anàlisi per determinar la lectura del soroll de fons (*background*) i pous control en els quals es van posar tots els reactius excepte el pèptid per avaluar la presència de respostes inespecífiques dels sèrums. En el cas dels controls blancs es van afegir 2µg/BSA pouet.

A l'endemà, després de la incubació, es van bloquejar les plaques amb 2% de BSA en tampó carbonat/bicarbonat 0,05M pH=9,6 durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament, es van eliminar els continguts del tampó de bloqueig i es va addicionar 100µL de la dilució de cadascun dels sèrums d'assaig. Els sèrums es van diluir a una concentració 1:50 en tampó RIA suplementat amb 10% de FBS. Es va deixar incubar durant 1h 30 minuts a temperatura ambient.

Passat el període d'incubació dels sèrums, es van fer 6 rentats amb tampó PBS-T_{0,05%} i es van afegir 100µL l'anticòs secundari amb el qual es vol treballar en cada assaig. Es van emprar anticossos anti-humà conjugats amb peroxidasa, que es van afegir a diferents dilucions en tampó RIA (IgG 1:1000, IgA 1:2000 i IgM 1:40000).

Finalment, es van tornar a rentar 6 vegades les plaques amb PBS-T_{0,05%} i es va revelar la placa mitjançant l'addició de 200µL de Sigmafast OPD. Aquesta darrera incubació va durar 30 minuts i finalment es va aturar la reacció mitjançant l'addició de 50µL de H₂SO₄ 2N i es va fer la lectura d'absorbància a una longitud d'ona de 492nm. Tots els sèrums analitzats es van analitzar per duplicat.

3.2.1.2. Assaigs amb plaques F96 Nunc ImmobilizerTM Amino

El protocol dut a terme amb aquest tipus de plaques és anàleg al dut a terme amb les plaques Costar DNA-Bind descrit en l'apartat anterior. El tipus d'unió del pèptid a la placa es dona mitjançant la formació d'un enllaç covalent com a conseqüència de la reacció dels grups amino amb els grups electròfils presents a la superfície d'aquest tipus de plaques³⁵¹.

3.2.2. Determinació d'anticossos contra pèptids modificats post-traduccionals biotinitats

L'ús de pèptids biotinitats implica que l'enllaç entre l'antigen i la placa serà del tipus biotina-avidina. La placa, que per aquest assaig és de la marca comercial Nunc i el model és MaxiSorp, s'ha de derivatitzar amb avidina o algun dels seus derivats per tal de poder unir de forma específica els pèptids biotinitats. El primer pas del protocol de determinació d'AMPAs amb pèptids biotinitats consisteix en l'aplicació de la proteïna NeutrAvidin.

En primer lloc, es va començar la sensibilització de les plaques amb l'addició de 100µL d'una dilució de NeutrAvidin en PBS a una concentració de 5µg/mL. Aquesta solució es va deixar incubar durant tota la nit a 4°C. A l'endemà, les plaques es van tornar a incubar durant 1 hora a 37°C i es van rentar 1 vegada amb PBS-T. Seguidament es va addicionar 100µL del pèptid biotinitat dissolt en PBS a una concentració d'1mg/mL a cada pouet. Es va tornar a incubar a 37°C durant 1 hora, i passat aquest període es va buidar el contingut de la placa i sense fer rentats previs, es va dur a terme el bloqueig de les plaques mitjançant l'addició de 250µL de PBS-T + 2% de BSA, que es van incubar durant 30 minuts a 37°C. Seguidament es van fer 3 rentats de les plaques i addicionar 100µL de les dilucions dels sèrums, recent preparades, a una concentració 1:250 en tampó RIA a cada pouet. Aquestes dilucions es van deixar a la placa incubant durant 1 hora a 37°C i seguidament es van deixar tota la nit a 4°C.

A l'endemà, es van rentar les plaques 3 vegades amb PBS-T i posteriorment es van addicionar 100µL de la dilució de l'anticòs necessari per cada assaig. Els anticossos emprats van ser anticossos anti-humà conjugats amb peroxidasa que es van afegir a diferents dilucions (IgG 1:4000, IgA 1:2000 i IgM 1:10000) en tampó RIA. La incubació va durar 1 hora a 37°C i seguidament es van rentar 3 vegades amb PBS-T. L'últim pas va ser el revelat de l'activitat peroxidasa mitjançant l'addició del seu substrat, OPD. Es van afegir 200µL per pouet i es va deixar incubar 30 minuts a temperatura ambient abans d'aturar la reacció mitjançant l'addició de 50µL de H₂SO₄ 2N. El resultat es va obtenir mitjançant la lectura de la placa a una longitud d'ona de 492nm. La lectura expressa els resultats en unitats d'absorbància, en densitats òptiques (OD).

3.2.3. Determinació d'anticossos contra proteïnes modificades post-traduccionalment

3.2.3.1. Determinació d'anticossos contra proteïnes carbamilades

El procediment de l'immunoassaig seguit va ser el següent. En primer lloc es va diluir la proteïna d'assaig en tampó carbonat/bicarbonat a una dilució de 10µg/mL. Es va sensibilitzar aplicant 50µL d'aquesta solució a cada pouet i es va deixar incubar durant tota la nit a 4°C. A l'endemà es va fer 1 rentat de les plaques amb PBS-T i seguidament es va dur a terme el bloqueig de les reaccions inespecífiques mitjançant l'addició de 100µL a cada pouet de PBS-T + 1% de BSA. Es va incubar durant 6 hores a 4°C. Es van rentar novament una vegada amb PBS-T i es van addicionar 50µL/pouet de les dilucions preparades de sèrum a una dilució de 1:50 en PBS-T + 1% de BSA. Es va tornar a incubar tota la nit a 4°C.

A l'endemà es van rentar les plaques 3 vegades amb PBS-T. Es van addicionar 50µL/pouet de la dilució de l'anticòs anti-humà conjugats amb fosfatasa alcalina necessari dels diferents isotips. La dilució es va fer en tampó PBS-T + 1% de BSA i les dilucions dels anticossos són 1:5000 per l'isotip IgG i IgM mentre que per l'IgA és de 1:1000. La dilució de l'anticòs secundari es va deixar incubar durant 3 hores i 30 minuts a 4°C. Aquesta dilució va ser retirada i les plaques es van rentar 3 vegades. El revelat de la placa es va dur a terme mitjançant l'addició de 200µL de SigmaFast pNPP a cada pouet – la reacció va ser aturada passats 30 minuts i finalment es va llegir l'absorbància a 405nm en un lector de plaques. La lectura expressa els resultats en unitats d'absorbància, en densitats òptiques (OD).

3.2.3.2. Determinació d'anticossos contra proteïnes amb adductes de MAA

Es va seguir el protocol descrit per *Thiele et al*¹⁶¹ per la determinació d'anti-MAA. L'assaig seguia els següents passos. En primer lloc es va sensibilitzar la placa amb la proteïna d'anàlisi (en la seva forma modificada amb MAA i/o la forma control). Es van afegir 100µL d'una dilució de la proteïna a una concentració de 20µg/mL en tampó carbonat/bicarbonat. Aquesta dilució es va incubar durant tota la nit a 4°C.

A l'endemà es van rentar 3 vegades les plaques i seguidament es va dur a terme el bloqueig mitjançant l'addició de 200µL de tampó caseïna al 2% + PBS-T durant 1 hora a temperatura ambient. Es van repetir els 3 rentats i es va procedir amb l'addició de 100µL de les dilucions dels sèrums, que havien estat prèviament preparades. Les dilucions per aquest assaig van ser de 1:250 pels isotips IgG i IgA i de 1:500 per l'isotip IgM – el tampó emprat per les dilucions va ser el 0,5% de caseïna + PBS-T. La incubació es va donar a temperatura ambient durant 2 hores i va ser seguida de 3 rentats amb PBS-T. Es va seguir amb l'addició de 100µL de la dilució de l'anticòs secundari conjugat a l'enzim peroxidasa. El tampó de dilució emprat va ser el mateix que en les dilucions dels sèrums i en aquest cas, la dilució pels 3 isotips (IgA, IgM i IgG) van ser de 1:5000. Finalment es va rentar novament la placa, en aquesta ocasió 5 vegades, i es van afegir 100µL de substrat-TMB per fer el revelat de la placa. Es va deixar incubar durant 23 minuts a temperatura ambient i es va aturar la reacció amb 50µL de H₂SO₄ 2N. Les plaques es van llegir a una longitud d'ona de 450nm. Els resultats es van obtenir en forma de densitats òptiques (OD).

3.2.4. Anàlisis estadístiques dels resultats dels ELISA

Les anàlisis es van dur sempre a terme amb les formes modificades dels diferents antígens peptídics i proteics testats així com també amb les seves formes control. En tots els casos, la reactivitat dels pèptids/proteïnes controls inclosos en l'assaig va ser restada de la reactivitat dels pèptids/proteïnes d'assaig amb les diferents PTMs. D'aquesta manera, s'assegura que la reactivitat mostrada per cada sèrum és específica de la modificació post-traducciona de l'antigen analitzat i que la resposta que s'està detectant, en conseqüència, és una resposta d'autoanticossos AMPA. Cada sèrum es va analitzar per duplicat.

En tots els ELISA dissenyats pel nostre grup es va incloure a cada placa una sèrie de dilucions successives fetes amb mostres de sèrums de pacients prèviament testats en assaigs d'*screening* i catalogats com a positius. Aquesta dilució seriada ens va permetre establir una corba estàndard de calibració a cada placa que ens va permetre transformar el resultat d'unitats de densitat òptica (OD) a unitats arbitràries (UA/mL) i homogeneïtzar així els resultats inter-placa. A cada dilució de la recta se li va assignar un valor en UA/mL i la transformació de valors d'OD a UA/mL es va dur a terme mitjançant la interpolació dels valors d'OD en una corba de regressió logística de 4 paràmetres. Els resultats obtinguts en UA/mL van servir per fer l'anàlisi de les diferències entre grups (AR vs donants de banc de sang, grup control) i la determinació de les corbes ROC.

A partir d'aquestes es va determinar el valor de punt de tall de positiu, establint una especificitat del 95%. Per considerar positiu un resultat, en tots els assaigs dissenyats en el nostre grup, s'havia de complir dues condicions – ser superior al punt de tall establert i presentar una diferència $>0,1$ en la resta dels valors d'OD obtinguts de l'antigen modificat i l'antigen control.

Les anàlisis de proporcions entre els resultats dels diferents grups analitzats es van comparar mitjançant l'ús del test de Fisher o bé el test χ^2 . Les variables contínues es van comparar mitjançant l'ús del test de Mann-Whitney i els resultats es van presentar com a medianes i rangs d'interquartil. Tots els p-valors obtinguts eren de dues cues i el nivell de significació estadística es va establir a $\alpha=0,05$. Tots els càlculs estadístics es van determinar amb el programa GraphPad Prism 7.

3.2.4.1. Condicions específiques dels assaigs anti-MAA

Seguint la descripció dels protocols de Thiele et al¹⁶¹, en el cas de l'assaig ELISA per la determinació dels anticossos anti-MAA (Anti-Alb-MAA, Anti-Fib-MAA i Anti-CFFCMaP), la recta de calibració inclosa a l'assaig es va preparar mitjançant la sensibilització dels pous de la recta amb un seguit de dilucions de l'immunoglobulina de l'isotip que es pretenia analitzar de concentració coneguda. A partir de la resposta obtinguda després de dur a terme l'immunoassaig, es va construir una recta que va permetre la interpolació del resultat en unitats de ng/mL. La positivitat es va establir mitjançant corbes ROC i/o determinant el punt de tall amb un 95% d'especificitat mitjançant l'anàlisi del valor del percentil 95 de la mostra control.

Pas	Paràmetres de l'estudi	Pèptid biotinilat	Pèptid sense biotinilar	Proteïna carbamílada	Proteïna amb adductes MAA
Preparació de la placa	Molècula	Neutravidina	S'utilitzen plaques Costar DNA-Bind o Plaques Nunc Immobilizer Amino que no requereixen preparació	S'utilitzen plaques Maxisorp en les quals la unió per adsorció de la proteïna no requereix preparació prèvia	S'utilitzen plaques Maxisorp en les quals la unió per adsorció de la proteïna no requereix preparació prèvia
	Concentració	5µg/mL			
	Tampó	PBS			
	Condicions incubació	Tota la nit a 4°C + 1h a 37°C			
Antigen	Concentració	1µg/mL	10µg/mL	10µg/mL	10µg/mL
	Tampó	PBS-T	Carbonat/Bicarbonat	Carbonat/Bicarbonat	Carbonat/Bicarbonat
	Condicions incubació	100µL/pouet 1h a 37°C	100µL/pouet Tota la nit a 4°C	50µL/pouet Tota la nit a 4°C	100µL/pouet Tota la nit a 4°C
Bloqueig unions inespecífiques	Proteïna bloqueig	2% BSA	2% BSA	1% BSA	2% Caseïna
	Tampó	PBS-T	Carbonat/Bicarbonat	PBS-T	PBS-T
	Condicions incubació	250µL/pouet 30 minuts a 37°C	250µL/pouet 1h a temperatura ambient	250µL/pouet 6h a 4°C	200µL/pouet 1h a temperatura ambient
Sèrums	Concentració	1:250	1:50	1:50	IgG i IgA – 1:250 IgM – 1:500
	Tampó	RIA	RIA	PBS-T + 1% BSA	PBS-T + 0,5% Caseïna
	Condicions incubació	100 µL/pouet 1h a 37°C + tota la nit a 4°C	100 µL/pouet 1h 30 minuts a temperatura ambient	50 µL/pouet Tota la nit a 4°C	100 µL/pouet 2h a temperatura ambient
Anticòs secundari	Concentració	IgG – 1:4000 IgA – 1:2000 IgM – 1:10000	IgG – 1:1000 IgA – 1:2000 IgM – 1:40000	IgG – 1:5000 IgA – 1:1000 IgM – 1:5000	IgG – 1:5000 IgA – 1:5000 IgM – 1:5000
	Tampó	RIA	RIA	PBS-T + 1% BSA	PBS-T + 0,5% Caseïna
	Condicions incubació	100µL/pouet 1h a 37°C	100µL/pouet 1h a temperatura ambient	50µL/pouet 3h 30 minuts a 4°C	100µL/pouet 1h a temperatura ambient
Solució de revelat	Solució	SigmaFast OPD 200µL/pouet	SigmaFast OPD 200µL/pouet	SigmaFast pNPP 200µL/pouet	Substrats TMB 100µL/pouet
	Condicions incubació	30 minuts a temperatura ambient	30 minuts a temperatura ambient	30 minuts a temperatura ambient	23 minuts a temperatura ambient
Solució d'aturada	Solució	H ₂ SO ₄ 2N 50µL/pouet	H ₂ SO ₄ 2N 50µL/pouet	NaOH 3N 50µL/pouet	H ₂ SO ₄ 2N 50µL/pouet

Taula 8: Taula resum dels diferents protocols d'ELISA que s'han emprat durant la realització d'aquesta tesi en funció del tipus d'antigen presentat.

3.3. Microarrays

Els microarrays dissenyats com a part dels estudis d'aquesta tesi són del tipus peptídic. Es va emprar aquesta plataforma per presentar diversos pèptids de forma simultània en forma d'antígens per la determinació de la resposta ACPA, que es va determinar per fluorescència. Amb aquesta plataforma es va poder fer l'anàlisi de múltiples estructures peptídiques amb uns requeriments molt baixos pel que fa tant al volum de sèrum com de la resta de reactius.

3.3.1. Preparació del suport sòlid pel microarray

En totes les anàlisis dutes a terme en aquesta tesi, es va treballar amb la unió del pèptid a portaobjectes de vidre, que van actuar com a suport sòlid, mitjançant unió covalent. Es van analitzar i comparar dos tipus d'enllaç covalent – mitjançant la derivatització dels vidres per fer la unió amb grups epoxi o mitjançant la derivatització amb grups N-hidroxisuccinimida-ester.

Es va treballar en l'optimització de la immobilització del pèptid en els vidres d'assaig. El procés d'optimització va consistir en l'anàlisi del tipus d'enllaç mitjançant el qual es donava la unió al vidre de forma més estable. Es van tenir dos factors en compte – el tipus derivatització del vidre i el tampó en el qual es dissol el pèptid per obtenir les condicions més favorables per la formació de l'enllaç. Durant els diferents assaigs, es van emprar vidres derivatitzats de dues maneres diferents.

3.3.1.1. Vidres derivatitzats amb grups epoxi

El protocol de derivatització dels microarrays els vidres amb grups epoxi que es va seguir, es descriu a continuació. En primer lloc, per mantenir sempre la mateixa posició del vidre, amb un llapis amb punta de diamant, es va fer una petita marca a la cantonada inferior esquerra. La superfície del vidre ha d'estar completament neta per poder dur a terme la derivatització. Per aquest motiu es van fer 3 rentats amb detergent i aigua, i seguidament es van esbandir amb abundant aigua destil·lada. Aquests rentats van ser seguits d'un últim rentat amb solució "piranya" ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 7:3) durant 30 minuts. Per tal de poder mantenir els vidres en una posició vertical, es van aguantar amb un accessori preparat per aquest propòsit i es van enfonsar en un recipient per mantenir-los en la solució el temps necessari. Passats els 30 minuts, es van retirar els vidres i es van esbandir 6 vegades amb aigua miliQ.

Seguidament es van afegir els vidres novament a una dilució de NaOH al 10% en aigua durant 30 minuts. Passat aquest període es van fer novament 3 rentats amb aigua miliQ i finalment 3 rentats més amb etanol pur. Amb molta cura, es van assecar els vidres amb aire comprimit. Es van col·locar els vidres en posició horitzontal i es van aplicar 300µL de 3-(glicidiloxipropil)-trimetoxisilà (GPTMS) amb una xeringa Hamilton. Posteriorment, es va cobrir el vidre on s'havia aplicat el reactiu amb un altre vidre i es va deixar actuar durant 30 minuts. Finalment, es van tornar a netejar els vidres 2 vegades amb petites quantitats d'etanol. Seguidament es van deixar submergits en etanol i es van posar al bany d'ultrasons durant 25 minuts. Passat aquest temps es van assecar curosament amb aire comprimit i es van col·locar al dessecador per treure la humitat com a mínim durant una nit. Un cop secs, estan preparats per poder fer el següent pas d'unió del pèptid (Figura 20).

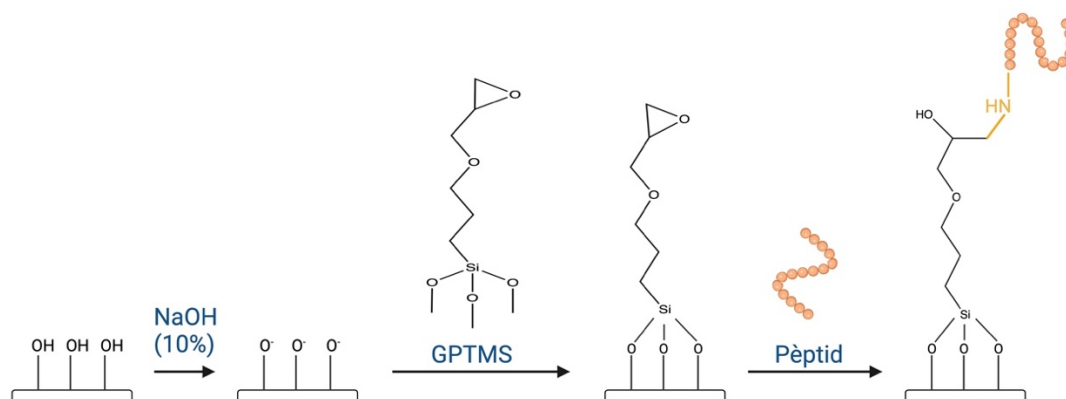


Figura 20: Procediment de preparació dels slides i immobilització del pèptid. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com.

3.3.1.2. Vidres comercials NHS-ester

L'altra estratègia d'unió del pèptid al vidre comercial és la que es proposa en diferents assaigs disponibles a nivell comercial i que consisteix en la unió del pèptid mitjançant la formació d'un enllaç covalent amb els grups altament reactius d'N-hidroxisuccinimida ester presents al vidre. En aquest cas no es requereix un protocol de preparació prèvia sinó que només s'haurà de dur a terme l'aplicació (o impressió) del pèptid diluït sobre el vidre que s'ha de tractar.

3.3.2. Immobilització dels pèptids en la superfície dels vidres

La impressió i immobilització de les molècules peptídiques en el suport sòlid o *slide* va consistir en el dipòsit de gotes o *spots* de la solució de la mostra, seguint la metodologia de la impressió per contacte dissenyada per ser emprada amb el tipus de robot d'impressió amb el qual es va treballar. La immobilització dels pèptids en la superfície del microarray es va dur a terme de forma automatitzada mitjançant l'ús d'un equip Miniarrayer BioOdyssey™ Calligrapher™, tal i com s'indica a la taula 5. L'agulla (*pin*) que diposita el pèptid sobre el *slide* carrega la mostra per capil·laritat i la col·loca en els punts que s'han configurat en l'apartat de disseny del microarray. Per evitar la contaminació entre les mostres/pèptids a imprimir, es duen a terme cicles de rentats i assecat del pin a l'estació de neteja de l'impressor de pèptids. Els rentats es duen a terme amb 10% etanol/aigua miliQ mitjançant sonicació i s'assequen posteriorment amb aire a pressió. Amb una sola càrrega de l'agulla, es poden imprimir un gran nombre d'*spots* ja que el volum que es diposita és molt petit, de l'ordre de nL.

3.3.2.1. Dilució dels pèptids per la seva posterior impressió

Seguint l'objectiu d'optimitzar les condicions de la unió dels pèptids als vidres, es va treballar amb dos tipus de tampons per la dilució de cada pèptid abans de ser introduïts en l'impressor. Els dos tampons emprats van ser el tampó carbonat-bicarbonat pH 9,6 i un tampó comercial Peptide Printing Buffer (#PEP) de l'empresa Arrayit (CA,USA). La resta de l'assaig es va dur a terme amb el protocol descrit a continuació.

El disseny del slides va ser diferent en els passos d'optimització de l'assaig i en l'anàlisi final dels diferents pèptids quimèrics derivats de fibrina, filagrina, enolasa i vimentina. En el primer cas, es va treballar només amb 3 pèptids (CFFCP-1, CFFCP-2 i CFFCP-3), que es van analitzar per quintuplicat, en dues condicions diferents d'assaig (tampons de dilució diferents). En l'anàlisi comparatiu dels 8 pèptids quimèrics (i els respectius controls d'arginina), cadascun dels pèptids es va imprimir per triplicat. A cadascun dels portaobjectes es van poder imprimir un total de 24 matrius en les quals s'organitzen els spots corresponents a cada pèptid, amb els pèptids ja mencionats, permetent per tant l'anàlisi de 24 mostres en cada vidre (Figura 21).

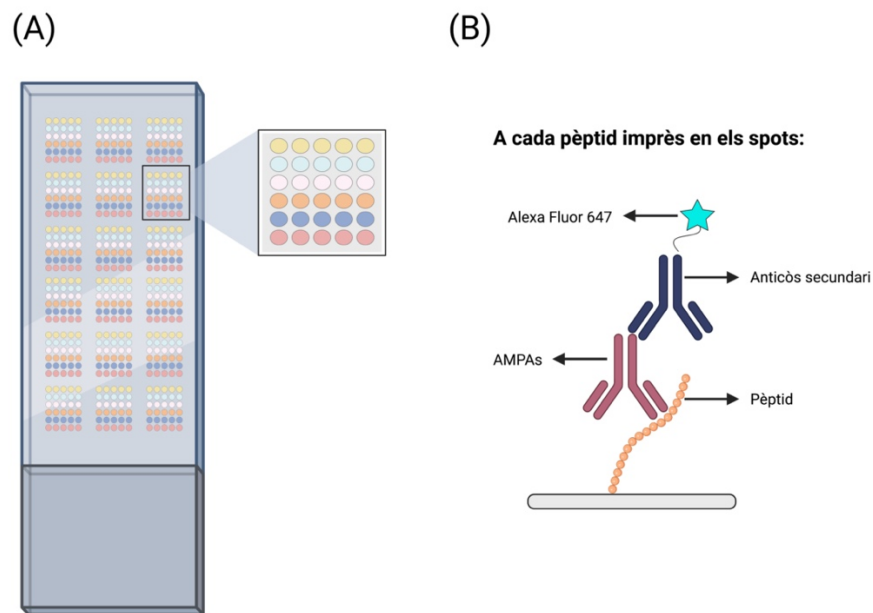


Figura 21: Esquemes de disseny dels microarrays. (A) Exemple de disseny de l'assaig imprès en el portaobjectes, amb detall en el disseny de la matriu que conte els spots de cada pèptid, en aquest cas de 5x6 spots, per dur a terme l'immunoassaig. Cada matriu servirà per estudiar la resposta als d'una mostra individual als diferents pèptids impresos en els spots que conté. (B) Esquema representatiu del immunoassaig que es du a terme en els spots del microarray. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com.

3.3.3. Immunoassaig amb suport de microarray

Per dur a terme l'immunoassaig, els vidres es van fixar en un adaptador (una gradeta de silicona) que actua com a suport i divideix el suport sòlid en 24 pouets, cadascun dels quals conté de forma individualitzada una matriu de spots. En primer lloc van bloquejar els vidres amb 2% de BSA en tampó carbonat/bicarbonat 0,5M pH 9,6 durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es van aplicar els sèrums d'anàlisi diluïts a una concentració 1:50 en tampó RIA i es va deixar incubar durant 1h 30 minuts a temperatura ambient. Es van rentar les plaques 6 vegades i es va afegir l'anticòs secundari, que permet la detecció dels autoanticossos d'estudi presents a la mostra, marcat amb el fluorocrom Alexa Fluor 647 a una dilució 1:250. Es va incubar a temperatura ambient durant 1 hora. Per concloure l'assaig, es van repetir novament els 6 rentats i es va dur a terme la lectura de fluorescència dels slides, amb una longitud d'ona d'excitació de 633nm i d'emissió de 647nm. La lectura es va dur a terme emprant l'equip Scan Array GX Plus, que permet el càlcul de la homogeneïtat de la intensitat com a coeficient de variació entre spots individuals i entre spots diferents. Per tal d'acceptar els resultats, es va concloure que el coeficient de variabilitat (CV) ha de ser inferior al 25%. Per l'assaig final, amb els 8 pèptids quimèrics, amb

l'objectiu de millorar la intensitat del *spot*, es va augmentar el temps d'incubació dels sèrums a 2 hores i es va fer servir una dilució de l'anticòs secundari menys diluïda (1:100).

3.3.4. Anàlisis estadístiques dels resultats dels microarrays

Els resultats dels nivells de fluorescència de cadascun dels pèptids d'assaig es va obtenir després de dues lectures dels càlculs mitjans dels tres *spots* replicats i testats per cada pèptid. Dels *spots*, analitzats per triplicat, com a mínim dos havien de ser acceptats per tal d'obtenir resultats vàlids. Si després de l'anàlisi per validar cada *spot*, en alguna anàlisi sèrum/pèptid no hi havia com a mínim dos *spots* vàlids, es va descartar el sèrum per l'anàlisi global. Es va establir un coeficient de variació màxim de 25% entre els dos *spots* replicats. Per cada pèptid es van restar els nivells mitjans del corresponent pèptid control per tal d'analitzar la fluorescència específica de la citrul·lina.

Per determinar les diferències entre els grups d'anàlisi, es va treballar amb el test de prova de signes de Wilcoxon, un test no paramètric ja que les distribucions no es van poder assumir com a normals. Es va dur a terme la comparació dels resultats obtinguts amb el suport de microarray amb els d'ELISA pels mateixos pèptids quimèrics. L'associació entre els valors obtinguts amb els microarrays i els obtinguts amb ELISA van ser analitzats amb el test no paramètric de correlació de *Spearman*. Per comparar percentatges, es va fer servir el test de proporcions de dues mostres. La comparació i les anàlisis de les corbes ROC, així com la resta d'anàlisis estadístiques es van calcular amb el programari estadístic STATA 15.0³⁵².

4. SÈRUMS

S'han inclòs mostres de diferents col·leccions de pacients en els anàlisis que s'han dut a terme i són presentats com a resultats en la Tesi Doctoral. En totes elles es va obtenir consentiment informat per part dels donants de les mostres biològiques. A continuació es descriuen l'origen de les mostres analitzades en els diferents estudis.

4.1. Anàlisi de detecció d'ACPAs amb pèptids citrul·linats en suport de microarray

En aquest assaig s'han inclòs sèrums que formen part de tres grups d'anàlisi diferents. S'han inclòs 70 sèrums de pacients d'AR que complien els criteris de classificació ACR/EULAR revisats de 2010. Tots eren pacients de la Unitat de Reumatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. El grup control està format per 70 sèrums obtinguts de donants de banc de sang del mateix hospital. Finalment, es van incloure 70 sèrums de pacients d'artritis psoriàsica del mateix centre després de la confirmació del compliment dels criteris de CASPAR. Aquests pacients es van incloure com a grup control de malalties reumàtiques inflamatòries (amb fenotip similar a l'AR) per la determinació de l'especificitat de l'assaig respecte l'AR.

4.2. Anàlisi de detecció d'AMPAs amb pèptids quimèrics, proteïnes carbamilades i proteïnes modificades amb adductes de MAA

Per els assaigs de determinació d'AMPAs realitzats amb els diferents pèptids quimèrics amb múltiples PTMs (citrul·linació, homocitrul·linació, acetilació i adductes de MAA), proteïnes carbamilades i proteïnes modificades amb adductes de MAA, es va treballar amb una cohort de 178 pacients d'AR diagnosticats d'acord al compliment dels criteris ACR/EULAR revisats de 2010. Tots els pacients provenen de la Unitat de Reumatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, on s'han fet les determinacions i s'ha comprovat el compliment dels criteris. Es van excloure pacients que presentaven artritis inflamatòria d'altres tipus. El grup control d'aquest assaig està compost per 120 mostres provinents de donants de sang del mateix hospital.

4.3. Anàlisi comparatiu de RP vs AR

Es va dur a terme l'assaig preliminar comparatiu del perfil ACPA i anti-CarP entre pacients d'AR i pacients de RP. Les mostres incloses pertanyen a 45 pacients de RP obtingudes en el moment del diagnòstic i que es corresponen a RP d'inici, recollides com a part d'un assaig clínic multicèntric (PALABA, NCT03669367). Els pacients inclosos com a grup control són en aquest cas pacients d'AR establerta seleccionats de l'estudi que forma part d'aquesta tesi (Apartats 2 i 3 de Resultats) i per tant, de la població d'AR descrita en el punt anterior (4.2).

Resultats

1. Disseny, preparació i desenvolupament de microarrays peptídics per la detecció d'anticossos contra pèptids/proteïnes citrul·linades en pacients d'artritis reumatoide

1.1 Síntesi i caracterització dels diferents pèptids quimèrics

Els diferents pèptids quimèrics inclosos als assaigs duts a terme per el desenvolupament de microarrays peptídics estan formats per fragments peptídics de varies proteïnes les quals es troben citrul·linades en pacients d'AR. Aquests fragments són els corresponents a la α -fibrina (617-631), la vimentina (47-72), l'enolasa (5-21) i la filagrina (306-324). Les posicions d'introducció de la citrul·lina es van determinar en base a estudis previs fets al nostre grup en el cas de les fraccions de α -fibrina¹⁴¹ i vimentina¹⁴⁴. El fragment de l'enolasa es correspon a l'antigen prèviament descrit i que constitueix el test CEP-1¹⁴⁶. En el cas de la filagrina es tracta del pèptid cíclic de filagrina que constitueix el test CCP1¹³⁷.

Per dur a terme l'assaig es van incloure pèptids formats per dominis de dues proteïnes diferents, anomenats pèptids quimèrics. Aquesta decisió es deu a resultats previs obtinguts al nostre grup en què es va mostrar una elevada antigenicitat vers aquest tipus de construccions peptídiques^{142,144,261}. En aquests assaigs previs també es va determinar la capacitat diagnòstica de diferents pèptids que han estat finalment inclosos en els immunoassaigs com a part d'aquest apartat. Els noms, fragments peptídics i estructures primàries dels diferents pèptids quimèrics inclosos en l'assaig es mostren en la Taula 9.

Els pèptids ja prèviament testats en immunoassaigs d'ELISA són els pèptids quimèrics que inclouen fragments de vimentina i fibrina o filagrina (CFVCP i CVFCP)¹⁴⁴ i els pèptids que inclouen fragments de fibrina i filagrina¹⁴¹ (CFFCP-1, CFFCP-2 i CFFCP-3). Com a antígens nous testats en aquest assaig per primera vegada trobem el pèptid quimèric de fibrina i enolasa citrul·linat (CFECP), el pèptid quimèric de vimentina i enolasa citrul·linat (CVECP) i el pèptid quimèric d'enolasa i filagrina citrul·linat (CEFCP).

De forma paral·lela a la síntesi dels pèptids quimèrics citrul·linats, es van també sintetitzar en la seva forma control. Aquests pèptids presenten la mateixa estructura primària que els fragments inclosos en els pèptids quimèrics però en les posicions on els pèptids d'estudi presenten citrul·lines, aquests mantenen les arginines natives. La seva nomenclatura inclou una R en referència a les arginines que presenten (CFFCP-R, CFVCP-R, CVFCP-R, CFECP-R, CVECP-R i CEFCP-R).

Pèptid	Fragments proteïnes	Estructura
CFFCP-1	Fibrina/Filagrina	HSTKRGHAKSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRCGRSGS
CFFCP-2	Fibrina/Filagrina	HSTKRGHAKSCitPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRCGRSGS
CFFCP-3	Fibrina/Filagrina	HSTKCitGHAKSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRCGRSGS
CFECP	Fibrina/Enolasa	HSTKRGHAKSRPVCitG-CKIHACitEIFDSCitGNPTVEC
CFVCP	Fibrina/Vimentina	HSTKRGHAKSRPVCitG-STSRSLYACSPGGVYATRSCAVRLCitS
CVECP	Vimentina/Enolasa	STSRSLYASSPGGVYATRSSAVRLCitS-CKIHACitEIFDSCitGNPTVEC
CEFCP	Enolasa/Filagrina	KIHACitEIFDSCitGNPTVE-HQCHQESTCitGRSRGRCGRSGS
CVFCP	Vimentina/Filagrina	STSRSLYASSPGGVYATRSSAVRLCitS-HQCHQESTCitGRSRGRCGRSGS

Taula 9: Estructures primàries dels pèptids quimèrics citrul·linats derivats de les proteïnes fibrina, filagrina, vimentina i enolasa emprats als assaigs inclosos en aquest apartat.

Els pèptids inclosos a l'assaig havien estat sintetitzats, ciclats i purificats a l'USiBAP amb anterioritat. El balanç especificitat/sensibilitat dels pèptids CFFCP-1, CFFCP-2, CFFCP-3, CFVCP i CVFCP havien estat calculats ens els estudis mencionats prèviament. Els resultats d'aquest balanç en cadascun dels pèptids individuals van resultar satisfactoris i conseqüentment van ser considerats per la seva inclusió en el present estudi enfocat al disseny d'un sistema múltiplex.

Els pèptids CFECP, CVECP i CEFCP havien estat prèviament sintetitzats, però encara no se n'havia testat la capacitat diagnòstica com antígens. Per aquest estudi, els tres pèptids van ser caracteritzats, i posteriorment testats en els immunoassaigs en format ELISA per determinar-ne la validesa de forma prèvia a la seva inclusió en el disseny múltiplex. La caracterització es va dur a terme mitjançant UPLC i espectrometria de masses. En tots els casos es va confirmar una puresa superior al 95% i l'anàlisi per espectrometria de masses va permetre comprovar que la síntesi s'havia donat de forma correcta (Figures 22, 23 i 24).

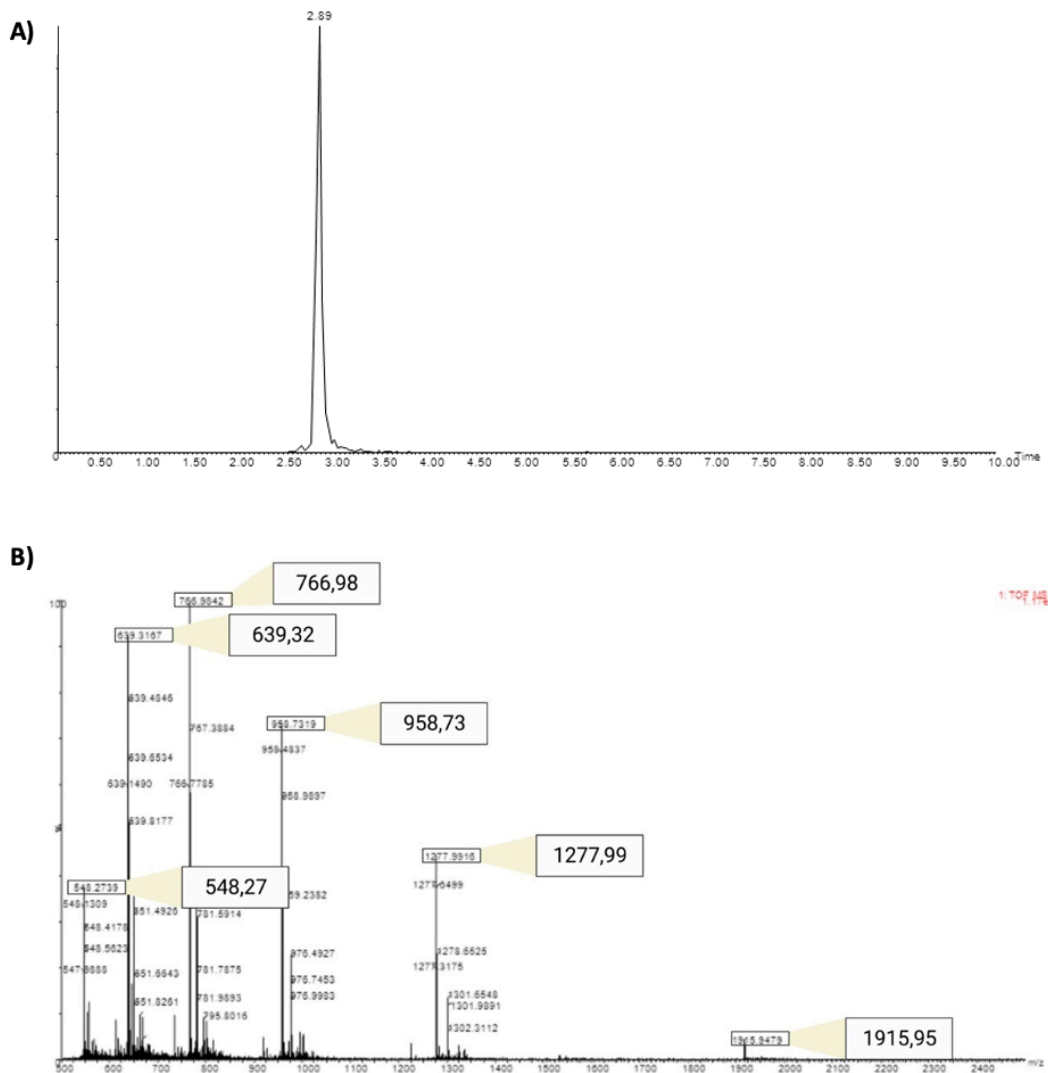


Figura 22: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CFCEP. (A) Caracterització de l'elució del pèptid CFCEP en un equip d'UPLC Acquity BEH amb una columna C₁₈ (2,1x100mm, 1,7µm). El gradient emprat és lineal (5%-100% de solvent B – 20mM d'acid fòrmic en ACN – en solvent A – 20mM d'acid fòrmic en H₂O) durant 10 minuts a 0,3mL/min. (B) Espectre de masses registrat en mode d'ió positiu dins d'un rang de m/z de 500-2500. La relació de m/z calculades teòricament són les següents: [M+2H]⁺²=1915,46, [M+3H]⁺³=1277,31, [M+4H]⁺⁴=958,24, [M+5H]⁺⁵=766,79, [M+6H]⁺⁶=639,16, [M+7H]⁺⁷=547,99; experimental m/z: [M+2H]⁺²=1915,95, [M+3H]⁺³=1277,99, [M+4H]⁺⁴=958,73, [M+5H]⁺⁵=766,98, [M+6H]⁺⁶=639,32, [M+7H]⁺⁷=548,27.

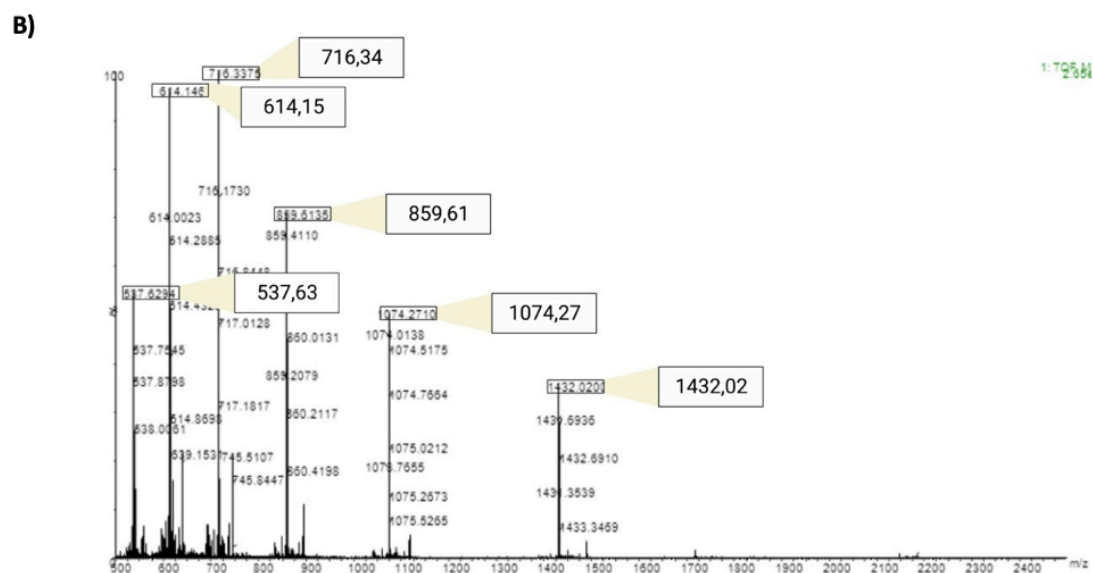
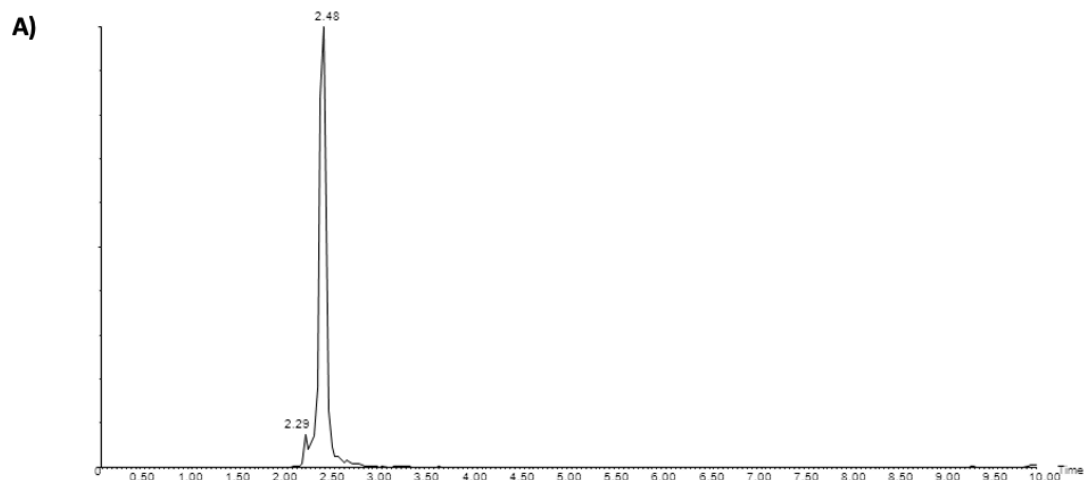


Figura 23: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CFCFP. (A) Caracterització de l'elució del pèptid CFCFP en un equip d'UPLC Acquity BEH amb una columna C18 (2,1x100mm, 1,7µm). El gradient emprat és lineal (5%-100% de solvent B – 20mM d'àcid fòrmic en ACN – en solvent A – 20mM d'àcid fòrmic en H₂O) durant 10 minuts a 0,3mL/min. (B) Espectre de masses registrat en mode d'ió positiu dins d'un rang de m/z de 500-2500. La relació de m/z calculades teòricament són les següents: [M+3H]⁺³=1431,02, [M+4H]⁺⁴=1073,51, [M+5H]⁺⁵=859,01; [M+6H]⁺⁶=716,01, [M+7H]⁺⁷=613,87, [M+8H]⁺⁸=537,26; experimental m/z: [M+3H]⁺³=1432,02, [M+4H]⁺⁴=1074,27, [M+5H]⁺⁵=859,61; [M+6H]⁺⁶=716,34, [M+7H]⁺⁷=614,15, [M+8H]⁺⁸=537,63.

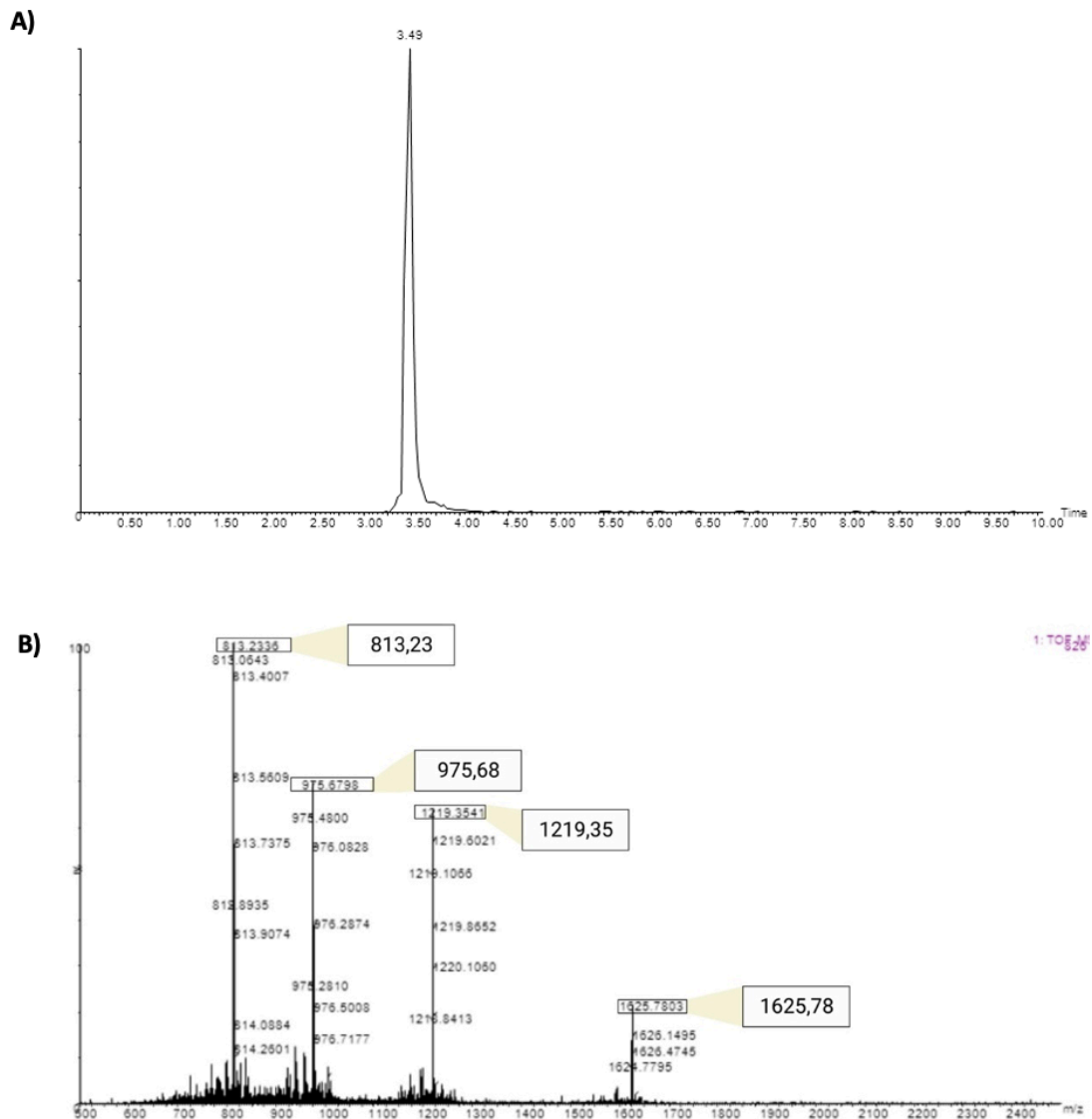


Figura 24: Caracterització per UPLC-MS del pèptid CVECP. (A) Caracterització de l'elució del pèptid CVECP en un equip d'UPLC Acquity BEH amb una columna C18 (2,1x100mm, 1,7µm). El gradient emprat és linear (5%-100% de solvent B – 20mM d'àcid fòrmic en ACN – en solvent A – 20mM d'àcid fòrmic en H₂O) durant 10 minuts a 0,3mL/min. (B) Espectre de masses registrat en mode d'ió positiu dins d'un rang de m/z de 500-2500. La relació de m/z calculades teòricament són les següents: [M+3H]⁺³=1625,14, [M+4H]⁺⁴=1219,11, [M+5H]⁺⁵=975,49; [M+6H]⁺⁶=813,07; experimental m/z: [M+3H]⁺³=1625,78, [M+4H]⁺⁴=1219,35, [M+5H]⁺⁵=975,68; [M+6H]⁺⁶=813,23.

1.2 Resultats de la determinació d'ACPA emprant ELISA com immunoassaig

Les molècules peptídiques novament dissenyades CFECP, CVECP i CEFCP es van emprar com antígens en un immunoassaig tipus ELISA per a la detecció d'anticossos de la família ACPA, de l'isotip IgG, en una cohort de 100 pacients d'AR i en 87 mostres de donants de banc de sang, tal i com s'havia fet prèviament amb la resta de pèptids^{141,144} que també van formar part del multiplex. Els antígens es van unir de manera covalent a plaques Costar.

La comparació dels resultats obtinguts amb les mostres d'AR i de les mostres de donants de banc de sang, el grup control de l'experiment, van permetre fer la representació de les corbes ROC de cadascun dels antígens d'estudi. La representació de les corbes ROC, els valors de les àrees sota la corba (AUC, de l'anglès *area under curve*), els valors predictius positius, valors predictius negatius i els valors de sensibilitat establint una especificitat del 98,85% es mostren a continuació (Taula 11, Figura 25). Amb els resultats obtinguts en aquesta prova ELISA es va poder determinar que tots ells presentaven un balanç de sensibilitat/especificitat i que, per tant, eren bons candidats per ser inclosos en l'estudi simultani del tipus microarray que va incloure les diferents estructures quimèriques citrul·linades.

	CFECP	CVECP	CEFCP
Àrea sota la corba	0,78	0,71	0,78
(95% IC)	(0,71;0,86)	(0,64;0,79)	(0,71;0,85)
Sensibilitat (%)	56	37	63
Valor predictiu positiu	98,2%	97,4%	98,4%
(95% IC)	(91,6;100)	(86,2;99,9)	(90,6;100)
Valor predictiu negatiu	66,2%	57,7%	69,9%
(95% IC)	(57,3;74,2)	(49,4;65,8)	(61;77,9)

Taula 11: Resultats estadístics obtinguts de l'anàlisi dels pèptids CFECP, CVECP i CEFCP emprats com a antígens per la detecció d'ACPA en una població de pacients d'AR (n=100) i mostres del banc de sang (grup control, n=87).

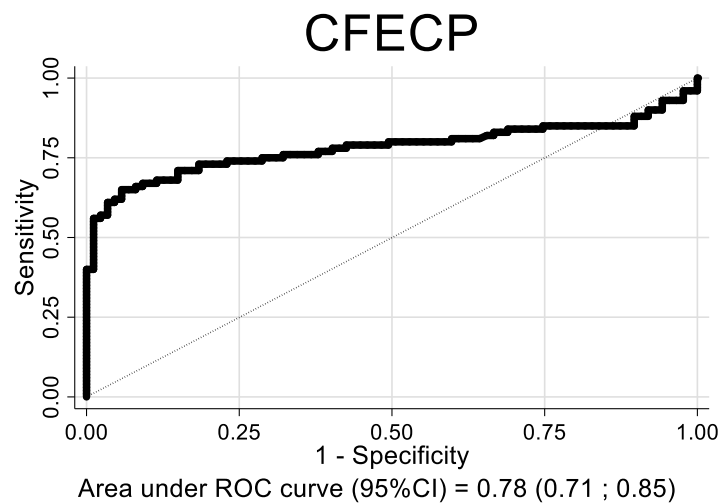
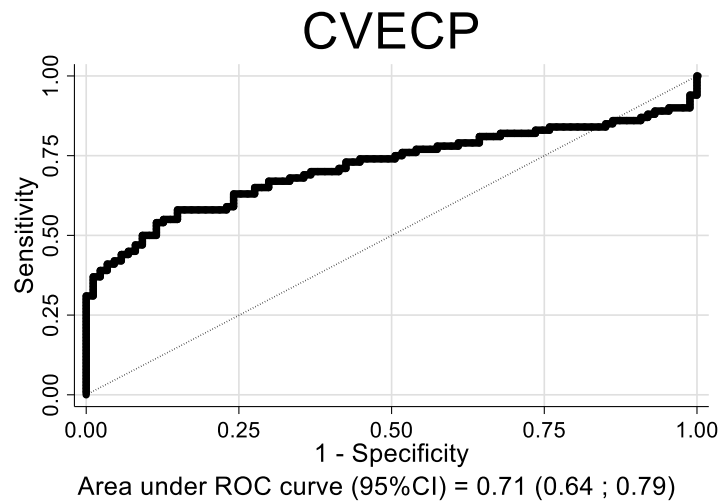
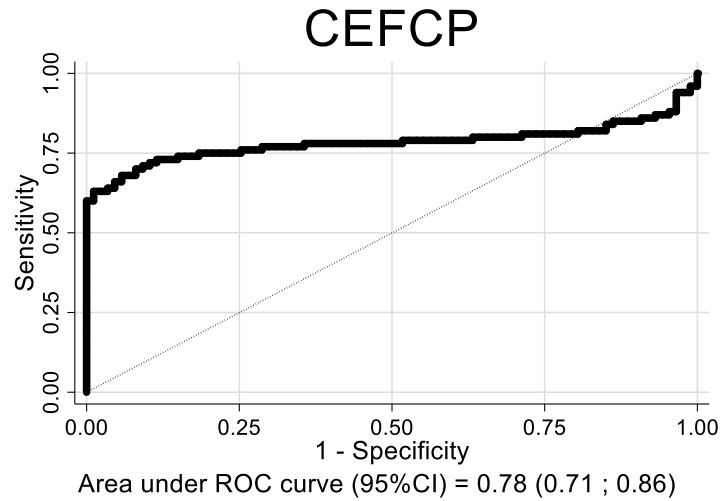


Figura 25: Anàlisi mitjançant corbes ROC dels pèptids CEFCP, CVECP i CFECP. Resultats obtinguts de la comparació en la cohort de pacients d'AR (n=100) vs donants de banc de sang (grup control, n=87).

1.3 Optimització del protocol d'immunoassaig dels microarrays peptídics

Una vegada seleccionats els pèptids que s'havien d'incloure en l'assaig en format microarray, es va començar a treballar en l'optimització dels assaigs en aquesta nova superfície, procés essencial per trobar les millors condicions de treball. Per dur a terme aquest procés d'optimització, en primer lloc es va treballar amb els pèptids quimèrics de fibrina i filagrina (CFFCP-1, CFFCP-2 i CFFCP-3). Es van escollir aquests tres antígens peptídics per a optimitzar l'immunoassaig degut a l'extensiva caracterització que se n'havia fet en assaigs previs al grup^{141,142,261}. Per dur a terme les diferents proves incloses en el procés d'optimització, cadascun dels pèptids va ser imprès en el vidre per quintuplicat.

Els paràmetres que es van tenir en consideració per optimitzar l'assaig van incloure el tipus de modificació del portaobjectes per poder unir covalentment el pèptid d'assaig i el tipus de tampó emprat per la dilució del pèptid i posterior acoblament al portaobjectes. Per dur a terme aquestes anàlisis comparatives, es van testar 24 sèrums diferents entre els quals es van incloure tant mostres de pacients d'AR (n=18) com mostres de banc de sang com a control (n=6).

1.3.1 Enllaç del pèptid al portaobjectes

En aquesta primera anàlisi es van comparar les diferències obtingudes entre l'acoblament covalent dels pèptids al portaobjectes mitjançant dos grups funcionals diferents:

- 1) *Portaobjectes derivatitzats al laboratori amb (3-glicidiloxipropil)-trimetoxisilà (GPTMS) i que presenten a la superfície grups epoxi per unir els pèptids.*
- 2) *Portaobjectes comercials (NHS microarray substrate slides – Arrayit, CA, USA) que presenten a la seva superfície ester de N-hidroxisuccinimida per unir els pèptids.*

L'assaig es va dur a terme en condicions idèntiques en els dos tipus de portaobjectes. A cada matriu/pouet d'assaig es van imprimir els pèptids per quintuplicat en la superfície dels portaobjectes tal i com s'ha descrit prèviament a l'apartat 3.3.1 del capítol de Materials i Mètodes. Un cop impresos els pèptids als diferents portaobjectes, es va dur a terme l'immunoassaig seguint el protocol descrit a l'apartat 3.3.3 del capítol de Materials i Mètodes.

Es va observar la reactivitat esperada en els dos grups ja que en alguns dels pacients del grup d'AR seropositius, la reactivitat era evident. En el cas de les mostres de banc de sang no s'observava cap reactivitat, i només en alguns casos es mostrava una reactivitat residual que es reflectia en forma d'spots poc visibles amb una fluorescència molt tènue (Figura 26).

La comparació de la lectura de fluorescència dels resultats dels immunoassaigs fets amb els dos tipus de vidre va mostrar, clarament, una major reactivitat en el cas dels vidres derivatitzats amb GPTMS. Addicionalment, també es va poder observar de forma clara que els spots del vidre derivatitzat del laboratori presentaven una major homogeneïtat entre els quintuplicats dels pèptids i la variació entre els diferents punts del mateix pèptid imprès per quintuplicat era clarament inferior en el cas dels vidres derivatitzats amb grups epoxi. Aquestes clares diferències ens van fer decantar per la funcionalització epoxi com a la millor condició i per tant, la base correcta per seguir optimitzant l'assaig (Figura 26).

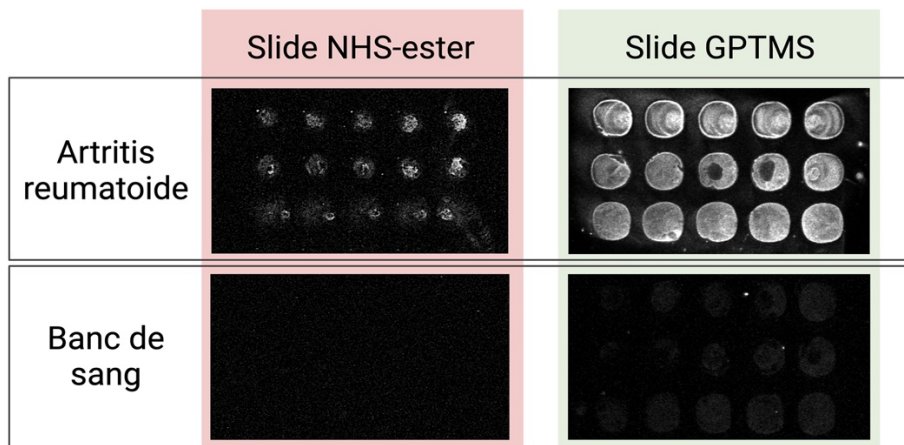


Figura 26: Comparació dels resultats obtinguts amb els portaobjectes derivatitzats en les dues condicions d'anàlisi. Exemple dels resultats obtinguts en les diferents condicions d'assaig fent l'anàlisi d'un sèrum de pacient d'AR i d'una mostra control provinent del banc de sang. En la figura es pot comprovar com els vidres tractats amb GPTMS presenten spots de cada pèptid més homogenis que els vidres que presenten NHS-ester. En la comparació d'AR vs BS dins de cadascun dels vidres s'observen les diferències evidents i esperades en els nivells de reactivitat dels dos grups en front als pèptids citrul·linats. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

1.3.2 Tampó de dilució del pèptid

Un cop determinades les millors condicions en relació al suport sòlid, es va procedir a analitzar la segona condició d'assaig que es pretenia optimitzar, el tampó emprat en la dilució del pèptid per poder ser imprès en el portaobjectes. L'estudi es va dur a terme de la mateixa manera que en l'apartat anterior. Es van derivatitzar els slides necessaris per realitzar l'assaig comparatiu amb GPTMS i es va dur a terme la impressió dels pèptids diluïts en els dos tampons d'assaig: tampó Arrayit comercial i tampó Carbonat/bicarbonat pH=9,6 preparat al laboratori.

Els resultats obtinguts en les mostres d'AR positives van permetre mostrar a simple vista una major homogeneïtat dels spots en el cas de les mostres impreses en el vidre diluïdes en tampó carbonat preparat fresc al laboratori abans de dur a terme la dilució. Tant la forma dels diferents punts d'impressió quintuplicats de cadascun dels pèptids d'assaig com la seva homogeneïtat eren més reproduïbles en el cas del tampó carbonat (Figura 27). L'anàlisi de les dades obtingudes amb aquest assaig preliminar d'optimització també va apuntar que la dilució dels pèptids en tampó carbonat permetia una major detecció de casos positius d'ACPA, i per tant una major sensibilitat. Així doncs, es va concloure la millor opció era l'ús del tampó carbonat.

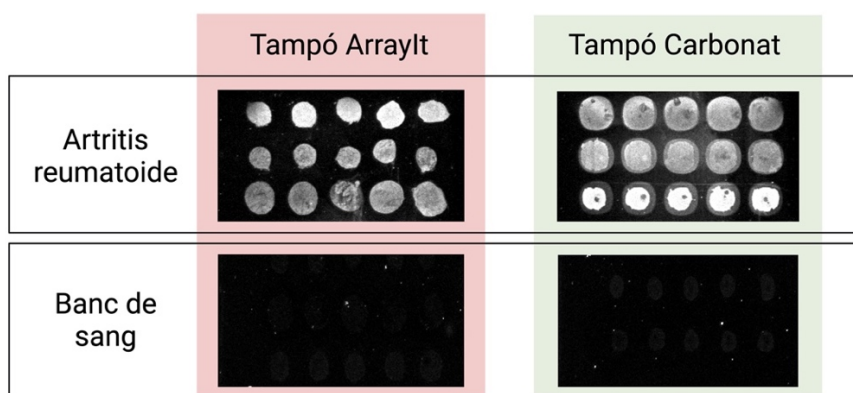


Figura 27: Comparació dels resultats obtinguts amb els slides amb el pèptid imprès en els dos tipus de tampó analitzats. Exemple dels resultats obtinguts en les diferents condicions d'assaig fent l'anàlisi d'un sèrum de pacient d'AR i d'una mostra control provinent del de banc de sang. En la figura es pot comprovar com els vidres on el pèptid aplicat ha estat dissolt en tampó carbonat presenten spots més homogenis que els vidres on el pèptid aplicat ha estat dissolt en tampó comercial. En la comparació d'AR vs BS en vidres tractats amb les mateixes condicions s'observen les diferències evidents i esperades en els nivells de reactivitat dels dos grups en front als pèptids citrul·linats. Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

1.4 Resultats de la determinació d'ACPA emprant microarrays peptídics

L'anàlisi va consistir en la comparació de la reactivitat als 8 pèptids quimèrics citrul·linats aplicats per triplicat en cada portaobjectes, en diferents cohorts d'estudi – una població de 70 pacients d'AR, 70 mostres de donants del banc de sang i 70 mostres de pacients d'artritis psoriàsica (PsA). Les mostres dels pacients de PsA van ser incloses en l'assaig per poder determinar l'especificitat del test respecte altres malalties reumàtiques. Es va escollir la PsA degut a la similitud de manifestació de símptomes clínics i inflamació que comparteix amb l'AR.

1.4.1 Resposta ACPA i nivells de fluorescència observats

Els immunoassaigs es van dur a terme en els vidres derivatitzats amb grups epoxi sobre els quals es van imprimir els pèptids dissolts en tampó carbonat/bicarbonat seguint el protocol descrit a l'apartat 3.3.3 del capítol de Materials i Mètodes. Es van observar clarament nivells més alts de fluorescència (RUs, de *response units*) en els sèrums d'AR en els spots on hi havia units els pèptids citrul·linats. En la resta de parelles de mostres/pèptids, aquests resultats eren molt inferiors. És a dir, en els sèrums d'AR/pèptids control, mostres de banc de sang/pèptid citrul·linat o control i mostres de PsA/pèptids citrul·linats o control, els nivells d'intensitat de fluorescència eren més baixos, tal i com s'exemplifica a la Figura 28.

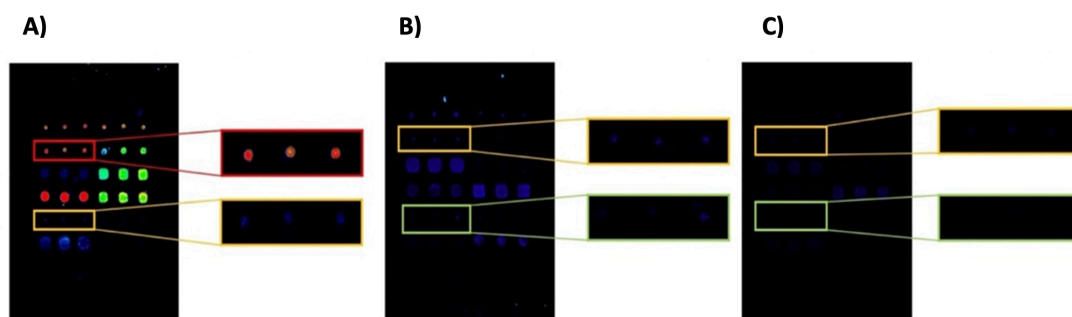


Figura 28: Representació gràfica de les intensitats de fluorescència obtingudes en les diferents combinacions de sèrum/tipus de pèptid. En els resultats de les tres combinacions es mostra a la part superior la resposta a un pèptid citrul·linat i a la part inferior la resposta al control d'arginina. Les mostres analitzades en les matrius mostrades a la figura es corresponen a: A) Un sèrum d'AR positiu per ACPA, B) un sèrum del grup control ACPA negatiu i C) un sèrum d'un pacient de PsA ACPA negatiu.

1.4.2 Càlcul de la variabilitat i criteris d'inclusió a l'assaig

Després de la lectura de la intensitat de fluorescència, en primer lloc es va dur a terme l'anàlisi de variabilitat entre els triplicats de cadascun dels pèptids inclosos en l'assaig. Per cada sèrum es va analitzar el CV de cada pèptid citrul·linat i el seu control respectiu. Es va determinar que per dur a terme els càlculs finals era necessari que com a mínim 2 dels punts triplicats de cada pèptid fossin vàlids en termes d'homogeneïtat i la combinació dels dos o tres spots acceptats havien de presentar un CV inferior al límit establert per poder ser inclòs el sèrum en l'assaig.

A nivell global es va observar clarament com en les parelles on els nivells de fluorescència eren baixos, el CV era més elevat que en el cas de la parella on es mostrava una fluorescència alta (AR/pèptids citrul·linats). D'acord amb això, es va decidir excloure de l'estudi els sèrums que presentessin un $CV > 30\%$ en les mostres de baixa intensitat i $CV > 25\%$ en les mostres d'alta intensitat. Els sèrums finalment inclosos en l'estudi de la capacitat diagnòstica del test (Taula 12) són aquells on tant el resultat obtingut pel pèptid citrul·linat com pel pèptid control van presentar com a mínim 2 spots amb un CV inferiors als límits establerts (Figura 29).

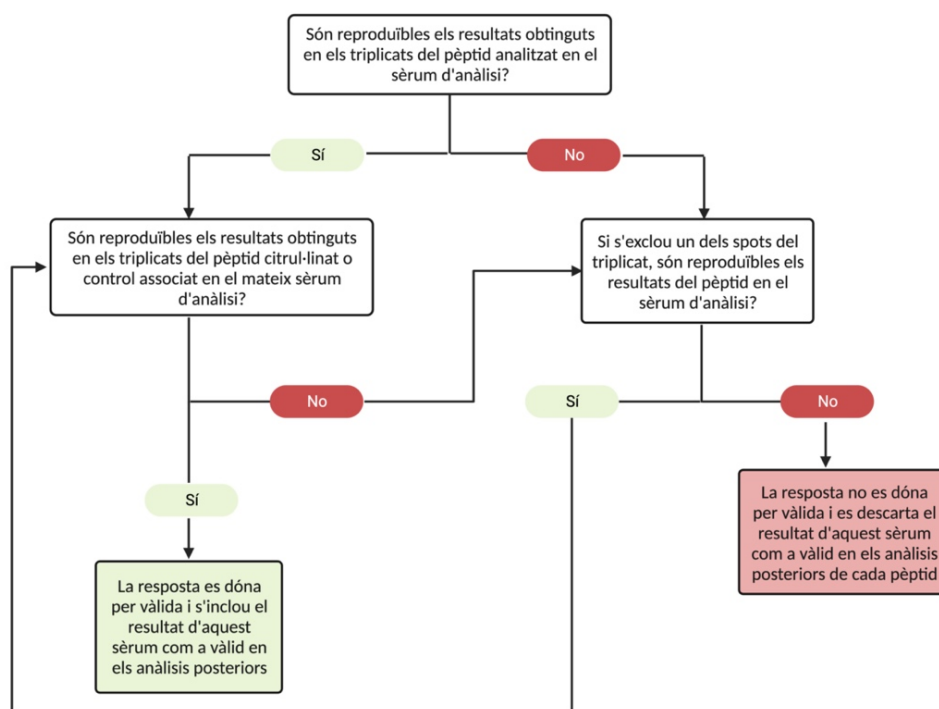


Figura 29: Diagrama de flux explicatiu del procés de validació dels resultats obtinguts per cadascun dels pèptids testats en pacients d'AR, BS i PsA. Es consideraran reproduïbles les mostres amb un $CV < 25\%$ en parelles de pèptid/sèrum amb alta intensitat (RUs) i amb un $CV < 30\%$ en parelles de pèptid/sèrum amb baixa intensitat (RUs). Imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com

Artritis reumatoide (n=70)

Pèptid citrul·linat	Sèrums descartats (CV>25%)	Pèptid Control	Sèrums descartats (CV>30%)	Parelles de pèptid citrul·linat/control descartades	Sèrums inclosos en l'assaig
CFFCP1	20 (28.57%)	CFFCP-R	21 (30.00%)	36 (51.43%)	34
CFFCP2	21 (30.00%)	CFFCP-R	21 (30.00%)	36 (51.43%)	34
CFFCP3	10 (14.29%)	CFFCP-R	21 (30.00%)	26 (37.14%)	44
CFECP	16 (22.86%)	CFECP-R	21 (30.00%)	32 (45.71%)	38
CFVCP	0 (0.00%)	CFVCP-R	13 (18.57%)	13 (18.57%)	57
CVECP	15 (21.43%)	CVECP-R	13 (18.57%)	24 (34.29%)	46
CEFCP	6 (8.57%)	CEFCP-R	21 (30.00%)	25 (35.71%)	45
CVFCP	8 (11.43%)	CVFCP-R	13 (18.57%)	18 (25.71%)	52

Mostres de banc de sang (n=70)

Pèptid citrul·linat	Sèrums descartats (CV>30%)	Pèptid Control	Sèrums descartats (CV>30%)	Parelles de pèptid citrul·linat/control descartades	Sèrums inclosos en l'assaig
CFFCP1	7 (10.00%)	CFFCP-R	14 (20.00%)	20 (28.57%)	50
CFFCP2	20 (28.57%)	CFFCP-R	14 (20.00%)	30 (42.86%)	40
CFFCP3	14 (20.00%)	CFFCP-R	14 (20.00%)	24 (34.29%)	46
CFECP	10 (14.29%)	CFECP-R	11 (15.71%)	18 (25.71%)	52
CFVCP	3 (4.29%)	CFVCP-R	7 (10.00%)	10 (14.29%)	60
CVECP	13 (18.57%)	CVECP-R	7 (10.00%)	17 (24.29%)	53
CEFCP	3 (4.29%)	CEFCP-R	11 (15.71%)	13 (18.57%)	57
CVFCP	8 (11.43%)	CVFCP-R	7 (10.00%)	14 (20.00%)	56

Artritis psoriàsica (n=70)

Pèptid citrul·linat	Sèrums descartats (CV>30%)	Pèptid Control	Sèrums descartats (CV>30%)	Parelles de pèptid citrul·linat/control descartades	Sèrums inclosos en l'assaig
CFFCP1	9 (12.86%)	CFFCP-R	3 (4.29%)	12 (17.14%)	58
CFFCP2	29 (41.43%)	CFFCP-R	3 (4.29%)	32 (45.71%)	38
CFFCP3	11 (15.71%)	CFFCP-R	3 (4.29%)	14 (20.00%)	56
CFECP	8 (11.43%)	CFECP-R	14 (20.00%)	18 (25.71%)	52
CFVCP	1 (1.43%)	CFVCP-R	6 (8.57%)	7 (10.00%)	63
CVECP	10 (14.29%)	CVECP-R	6 (8.57%)	15 (21.43%)	55
CEFCP	3 (4.29%)	CEFCP-R	14 (20.00%)	17 (24.29%)	53
CVFCP	7 (10.00%)	CVFCP-R	6 (8.57%)	13 (18.57%)	57

Taula 12: Número de sèrums descartats i inclosos en les diferents cohorts d'estudi incloses en l'assaig (AR, BS i PsA) com a conseqüència de l'alta variabilitat observada entre els spots per triplicat de cadascun dels pèptids analitzats. Els resultats de la primera columna fan referència a la resposta als pèptids citrul·linats mentre que els de la segona fan referència a la resposta als pèptids control. La tercera columna fa referència al nombre de sèrums exclosos degut a que la resposta observada en el pèptid citrul·linat i/o control ha excedit el límit de CV. L'última columna fa referència al número de sèrums amb CV inferiors al límit tant per el pèptid citrul·linat com per el control respectiu i que han estat finalment inclosos en l'assaig. El CV límit emprat en les parelles de sèrum/pèptid amb nivells d'alta intensitat és el 25% mentre que en les parelles de sèrum/pèptid amb nivells de baixa intensitat de fluorescència ha estat el 30%.

1.4.3 Resultats de cada pèptid inclòs dins el microarray peptídic

Per determinar la capacitat diagnòstica individual de cadascun dels pèptids en l'assaig es va treballar amb els sèrums inclosos després de la primera anàlisi, de tal manera que el nombre de sèrums d'assaig de cadascun d'ells era lleugerament diferent. Es va fer una anàlisi mitjançant corbes ROC de la capacitat discriminativa individual de cadascun dels pèptids quimèrics inclosos en l'assaig. Per poder fer aquests càlculs es van tenir en compte i comparar els resultats dels valors obtinguts en la cohort d'AR i la cohort de BS com a control (Figura 30).

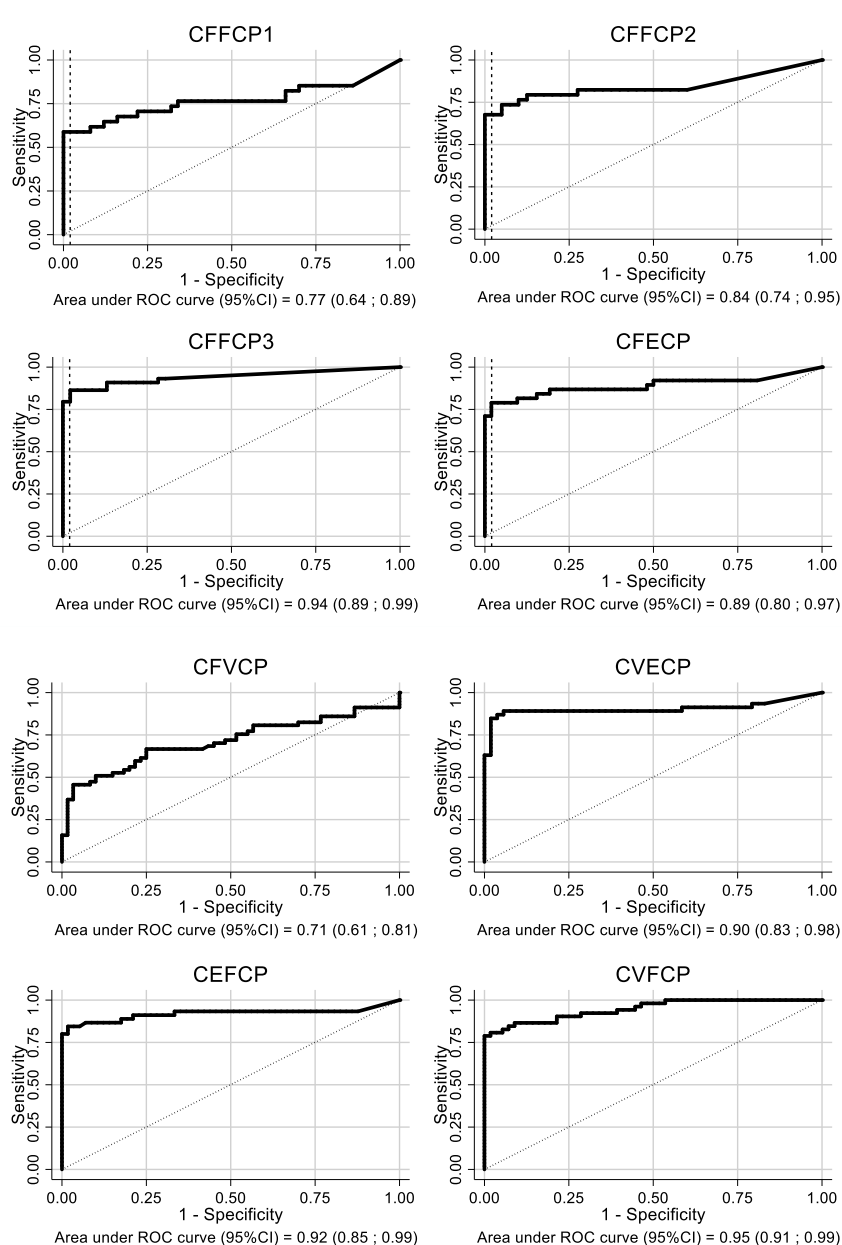


Figura 30: Anàlisi per corbes ROC dels resultats dels microarrays obtinguts en els pèptids citrul·linats quimèrics inclosos en l'assaig en les cohorts d'AR i BS.

Per determinar la sensibilitat (Taula 13) i especificitat de cadascun dels pèptids en la detecció d'AR es va treballar amb els valors de reactivitat obtinguts després de restar-ne la reactivitat del pèptid control. Tenir en compte el valor obtingut en el pèptid control a l'hora de determinar la reactivitat final de l'antigen citrul·lina ens permet concloure que la reactivitat final observada és exclusivament donada per l'efecte de la presència de la citrul·lina i que per tant la PTM és la regió de l'epítot coneguda.

Per altra part, es va voler observar l'efecte de la subtracció del valor del control en els resultats obtinguts de sensibilitat i especificitat de cada antigen. Es va observar que en termes generals, per la majoria de pèptids, tenir en compte el control feia augmentar la sensibilitat i per tant donava millors resultats. Només en el pèptid CFVCP restar la reactivitat del pèptid control va resultar en una lleugera disminució de la sensibilitat. En els pèptids CFECF i CEFCF, no hi havia diferències en la positivitats observada tenint en compte o no el pèptid control. Els resultats finals de sensibilitat s'han obtingut amb la reactivitat resultant de fer la resta entre la versió citrul·linada i la control. Per poder comparar les sensibilitats obtingudes s'ha treballat sempre establint aquest valor en referència a una especificitat del 98%.

Pèptid	Àrea sota la corba (95% IC)	Sensibilitat
CFFCP-1	0,77 (0,64;0,89)	58,8
CFFCP-2	0,84 (0,74;0,95)	67,7
CFFCP-3	0,94 (0,89;0,99)	79,6
CFECF	0,89 (0,80;0,97)	78,9
CFVCP	0,71 (0,61;0,81)	36,8
CVECP	0,90 (0,83;0,98)	84,8
CEFCF	0,92 (0,85;0,99)	84,4
CVFCF	0,95 (0,91;0,95)	80,8

Taula 13: Sensibilitats de cadascun dels diferents pèptids inclosos en l'assaig multiplex després de restar el seu control respectiu, amb una especificitat del 98%. Resultats obtinguts de la comparació del grup de pacients d'AR vs el grup de BS com a grup control.

La positivitat observada en els diferents grups inclosos en l'assaig es mostra en la Taula 14. Els resultats indiquen que els donants de banc de sang i els pacients d'artritis psoriàsica es comporten de manera similar i mostren una reactivitat molt baixa en comparació als pacients d'AR.

	Artritis reumatoide		Bancs de sang		Artritis psoriàsica	
	Sèrums analitzats	Sèrums positius (%)	Sèrums analitzats	Sèrums positius (%)	Sèrums analitzats	Sèrums positius (%)
CFFCP1	34	20 (58.8)	50	1 (2.0)	58	0 (0.0)
CFFCP2	34	23 (67.7)	40	0 (0.0)	38	1 (2.6)
CFFCP3	44	35 (79.6)	46	0 (0.0)	56	0 (0.0)
CFECP	38	30 (78.9)	52	1 (1.9)	52	5 (9.6)
CFVCP	57	21 (36.8)	60	1 (1.7)	63	0 (0.0)
CVECP	46	39 (84.8)	53	1 (1.9)	55	3 (5.5)
CEFCP	45	38 (84.4)	57	1 (1.8)	53	0 (0.0)
CVFCP	52	42 (80.8)	56	1 (1.8)	57	0 (0.0)

Taula 14: Positivitat observada per cadascun dels pèptids analitzats en els diferents grups inclosos en l'assaig. El nombre de sèrums analitzats s'expressa en nombre absolut mentre que en nombre de sèrums positius s'expressa en nombre absolut i percentatge, que es correspon a la proporció de sèrums positius respecte el total de sèrums inclosos a la mostra. En el cas dels AR, es correspon al valor de la sensibilitat.

Dins els pacients d'AR es mostren diferències entre els epítops analitzats. El pèptid que mostra una menor sensibilitat en aquest assaig és el pèptid quimèric de fibrina/vimentina (CFVCP), mentre que les altres combinacions de dominis proteics mostren nivells de sensibilitat més alts.

1.5 Comparació dels dos mètodes d'immunoassaig

Per dur a terme la comparació entre els resultats obtinguts amb el suport de microarray i els obtinguts emprant el mètode d'ELISA es va treballar amb valors sense corregir d'aquells sèrums/pèptids dels quals es tenia la informació pels dos assaigs. Els resultats de les comparacions es mostren a la Figura 31. La comparació es va fer mitjançant el càlcul del coeficient de correlació de Spearman, que en tots els casos va donar valors satisfactoris (entre 0.7 i 0.83, sent l'1 el màxim valor de correlació que es pot obtenir). Es va poder confirmar la correlació dels resultats obtinguts entre els pèptids analitzats pels dos mètodes de forma significativa ($p < 0.001$).

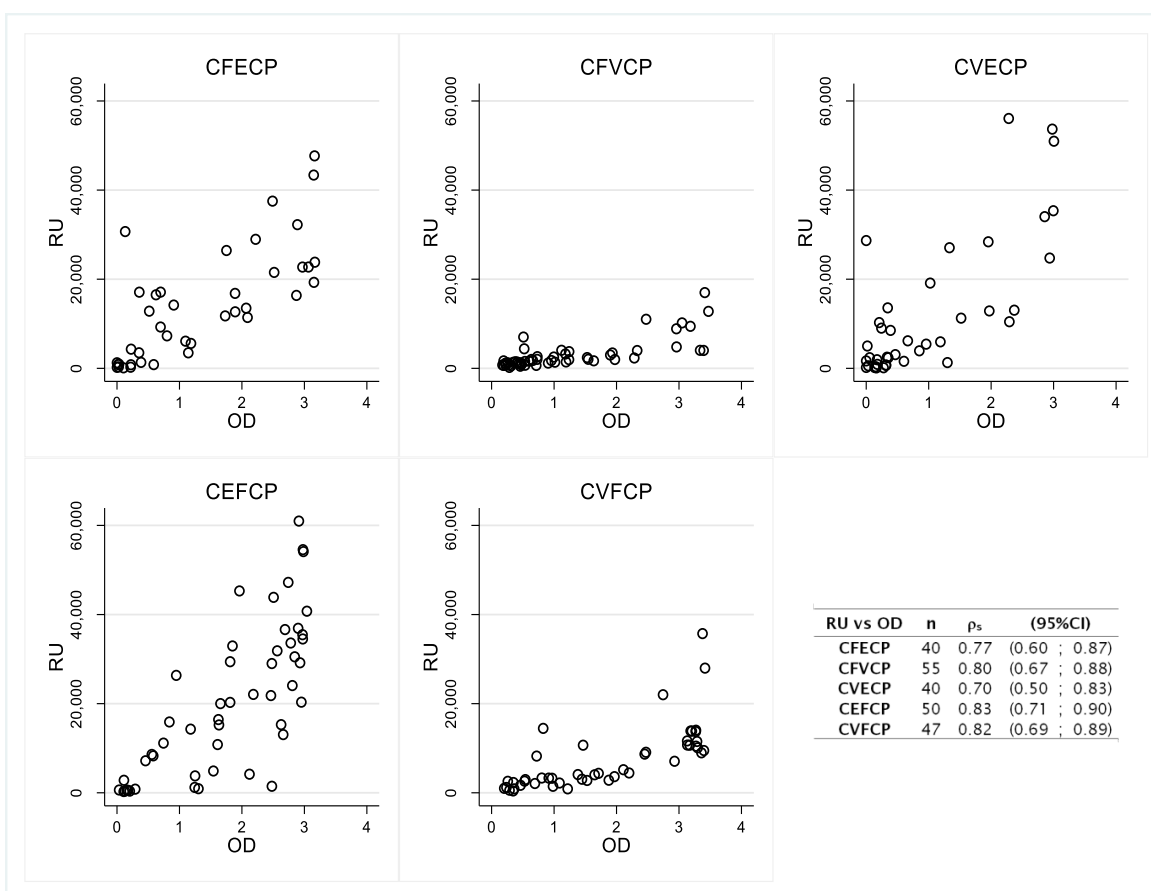


Figura 31: Relació dels valors de unitats de fluorescència (RUs) obtinguts en els microarrays i les corresponents unitats de densitat òptica (OD) obtinguts en els assaigs d'ELISA. Es comparen els resultats obtinguts en mostres de pacients d'AR. S'inclouen els resultats gràfics i el detall del nombre de sèrums inclosos en cada anàlisi (n), així com els valors obtinguts dels coeficients de Spearman (ρ_s) amb el seu interval de confiança al 95% (95%CI).

1.6 Comparació amb el test comercial CCP3

1.6.1 Correlació entre els nivells d'anticossos detectats amb CCP3 i la positivitat simultània de pèptids en el microarray

Finalment, per poder determinar la validesa del microarray desenvolupat, es va dur a terme la comparació dels resultats obtinguts, amb el nostre model, respecte els resultats obtinguts amb l'actual *gold standard* de detecció d'ACPAs en AR, el test CCP3. Es va fer una anàlisi de regressió lineal comparant els nivells d'anticossos detectats per CCP3 i el nombre de pèptids pels quals s'havia detectat una resposta positiva en el nostre multiplex. El resultat obtingut confirma que correlacionen bé ($r^2=0,7567$) i que la relació és positiva, és a dir, que es pot concloure que un augment dels nivells d'anticossos detectats amb CCP3 correlaciona de forma directa amb un major nombre de pèptids detectats de forma simultània amb el nostre sistema múltiplex. El model és estadísticament significatiu ($p = 0,0023$) (Figura 32).

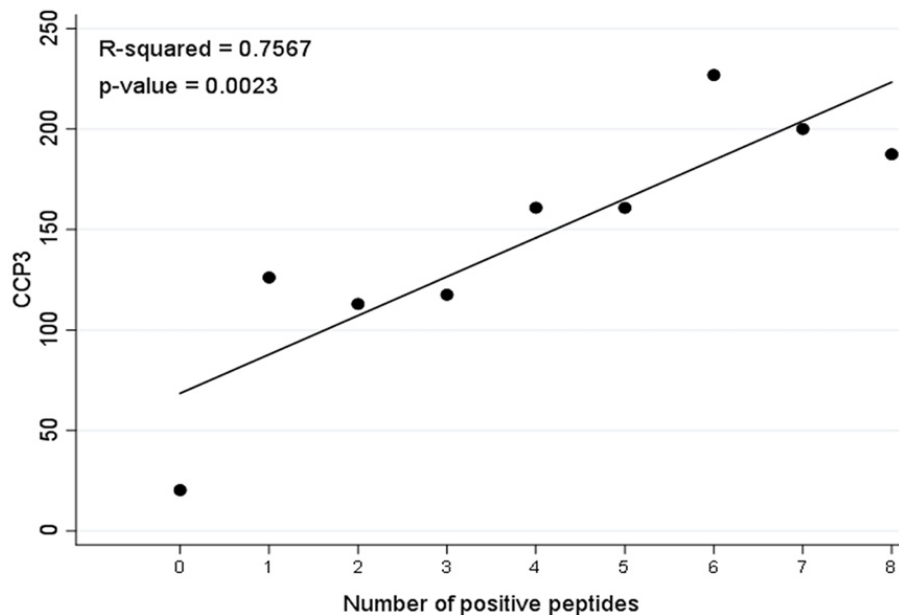


Figura 32: Model de regressió lineal entre els dos assaigs estudiats. S'observa que hi ha una associació positiva entre els valors mitjans d'anticossos detectats amb el test comercial CCP3 i el nombre de pèptids que es detecten de forma simultània amb el multiplex dissenyat.

1.6.2 Comparació individual de cadascun dels pèptids respecte el test comercial CCP3

En primer lloc es va comparar el rendiment diagnòstic de cadascun dels pèptids inclosos de forma individual en comparació amb el test CCP3. Per cada pèptid, els sèrums inclosos en l'assaig per determinar el rendiment són diferents com a conseqüència del procediment ja explicat de validació dels resultats. Un cop determinats quins sèrums es van considerar per l'assaig en cadascun dels pèptids, es va determinar el percentatge que havien estat classificats com a seropositius mitjançant el test CCP3 i es va dur a terme la comparació que es mostra a continuació (Taula 15).

Pèptid	Nº mostres acceptades segons el seu CV	Nº mostres positives de cada pèptid	Nº mostres positives per CCP3	p-valor
CFFCP1	34	20 (58.8)	30 (88.2)	0.006
CFFCP2	34	23 (67.7)	31 (91.2)	0.016
CFFCP3	44	35 (79.6)	38 (86.4)	0.395
CFECP	38	30 (78.9)	33 (86.8)	0.361
CFVCP	57	21 (36.8)	49 (86.0)	0.000
CVECP	46	39 (84.8)	39 (84.8)	1.000
CEFCP	45	38 (84.4)	40 (88.9)	0.535
CVFCP	52	42 (80.8)	44 (84.6)	0.604

Taula 15: Resultats de la comparació estadística de la sensibilitat individual de cada pèptid testat i els resultats obtinguts en el mateix grup de sèrums analitzats pel test comercial CCP3. En verd es mostren els p-valors que no mostren diferències significatives entre la positivitat dels dos assaigs comparats i en vermell es mostren els tres casos en els que s'observen diferències entre els dos assaigs.

Tal i com es mostra en la taula anterior, hi ha tres pèptids que es comporten de forma significativament discordant respecte el test CCP3 en termes de mostres positives detectades emprant el mateix grup de pacients. La resta de pèptids no mostren resultats que es puguin considerar significativament diferents, presentant en tots els casos nivells de positivitat alts i molt propers als obtinguts amb el gold-standard CCP3. Aquests resultats es van tenir en compte per dur a terme les diferents comparatives globals de l'assaig multiplex vs el test CCP3. Els resultats es mostren a continuació.

1.6.3 Determinació del punt de tall de positivitat en l'assaig multiplex

Per establir els criteris òptims de determinació del punt de tall de l'assaig multiplex, es va dur a terme un estudi de la concordança entre els resultats de positivitat del microarray, tenint en compte diferents condicions per establir la positivitat, i els obtinguts en el test CCP3. En aquesta comparativa es van incloure els resultats de 66 pacients dels quals es tenia informació de la resposta a un pèptid o més, mentre que els 4 restants van ser exclosos. Emprant els resultats de positivitat ACPA detectada amb CCP3 com a referència, es va calcular la sensibilitat i especificitat que tindria el nostre multiplex amb dos punts de tall diferents (2 o 3 pèptids positius simultanis). Dins de cadascun dels punts de tall estudiats, es va també analitzar si l'exclusió dels pèptids amb pitjor sensibilitat (CFFCP-1, CFFCP-2 i/o CFVCP) tenia algun efecte en la capacitat diagnòstica del test global.

1.6.3.1 Punt de tall 1: ≥ 3 pèptids (+)

Es va establir com a punt de tall de positivitat la presència mínima de 3 pèptids positius de forma individual per considerar el multiplex com a positiu de forma global. Es va comparar el balanç diagnòstic obtingut en funció del nombre de pèptids inclosos/descartats en l'assaig. Es van tenir en compte els diferents escenaris:

a) Inclusió de tots els pèptids – 8 pèptids en l'assaig:

En la primera anàlisi es van tenir en compte els 8 pèptids inclosos en l'assaig i es va establir que per considerar el microarray com a positiu a nivell global, s'havien de detectar 3 o més pèptids positius de forma simultània. Amb aquests paràmetres, la sensibilitat global del test era del 76,4% amb una especificitat del 90,9%. Es van detectar 42 casos positius del total de 55 que s'havien considerat positius per CCP3 i 10 negatius del total d'11 que s'havien considerat negatius per CCP3 (Taula 16, apartat A).

b) Exclusió dels pèptids CFFCP-1, CFFCP-2 i CFVCP – 5 pèptids d'assaig

En segon lloc ens es va repetir l'assaig però en aquest cas només es van incloure els resultats obtinguts amb 5 pèptids. Es van excloure els pèptids que havien mostrat una diferència estadísticament significativa en l'anàlisi individual de la comparació de positivitat detectada amb cadascun dels pèptids vs el test CCP3 (Taula 15), els pèptids CFFCP-1, CFFCP-2 i CFVCP.

Per treballar amb aquestes condicions, es va haver d'excloure un nou sèrum d'AR del qual no es disposava de la informació necessària pels pèptids restants que s'estaven analitzant, i el nombre global de mostres incloses va ser de 65. Els resultats obtinguts en aquestes condicions eren de 64,8% de sensibilitat i 90,9% d'especificitat. En aquestes condicions, es detectaven 35 casos del total de 54 casos detectats amb CCP3, mentre que la detecció de casos negatius es va mantenir igual que en les condicions d'anàlisi anteriors – 10 negatius del total d'11 considerats per CCP3. La sensibilitat doncs, va baixar respecte a l'anterior anàlisi en que es tenien en compte els 8 pèptids de forma simultània (Taula 16, apartat B).

c) Exclusió dels pèptids CFFCP-1, CFFCP-2 – 6 pèptids d'assaig

Finalment, es va realitzar una última anàlisi, en el qual es van tenir en compte 6 pèptids i es va dur a terme l'anàlisi amb un total de 65 pacients. Es van mantenir els pèptids de l'anàlisi anterior i es va recuperar el pèptid CFVCP, que havia estat prèviament exclòs. En aquest cas, la sensibilitat de l'assaig era del 72,2% i l'especificitat es va mantenir en el 90,9%. Es van detectar com a positius 39 casos del total de 54 casos positius detectats per CCP3 mentre que es van considerar negatius amb el múltiplex 10 sèrums del total d'11 sèrums considerats negatius amb CCP3 (Taula 16, apartat C).

1.6.3.2 Punt de tall 2: ≥ 2 pèptids (+)

Aquestes mateixes anàlisis es van realitzar considerant positiu el microarray quan només dos o més dels pèptids són positius de forma simultània, i els resultats obtinguts per les diferents condicions (5, 6 o 8 pèptids inclosos) són similars o moderadament superiors en termes de sensibilitat (8 pèptids inclosos: 85,5 vs 76,4; 6 pèptids inclosos: 81,5 vs 72,2; 5 pèptids inclosos (79,6 vs 64,8). L'especificitat, en canvi, es va veure notablement afectada ja que es van passar a considerar positius en el múltiplex sèrums que són negatius pel CCP3. Els canvis són notables (8 pèptids inclosos: 63,6 vs 90,9; 6 pèptids inclosos: 72,7 vs 90,9; 5 pèptids inclosos: 72,7 vs 90,9). D'aquesta manera, els resultats perden especificitat respecte els resultats obtinguts amb el test CCP3 (Taula 16, apartats D-F).

Nº pèptids considerats:	Microarray positiu si hi ha ≥ 3 (+)				Microarray positiu si hi ha ≥ 2 (+)					
	CCP3	Múltiplex amb ≥ 3 (+)	-	+	Total	CCP3	Múltiplex amb ≥ 2 (+)	-	+	Total
8	A)	-	10	1	11	D)	-	7	4	11
	+	13	42	55	E)	+	8	47	55	
	Total	23	43	66	Total	15	51	66		
		Sensibilitat	76,4				Sensibilitat	85,5		
		Especificitat	90,9				Especificitat	63,6		
5	B)	-	10	1	11	E)	-	8	3	11
	+	19	35	54	F)	+	11	43	54	
	Total	29	36	65	Total	19	46	65		
		Sensibilitat	64,8				Sensibilitat	79,6		
		Especificitat	90,9				Especificitat	72,7		
6	C)	-	10	1	11	F)	-	8	3	11
	+	15	39	54	Total	+	10	44	54	
	Total	25	40	65	Total	18	47	65		
		Sensibilitat	72,2				Sensibilitat	81,5		
		Especificitat	90,9				Especificitat	72,7		

Taula 16: Anàlisi de l'especificitat del test multiplex desenvolupat en comparació als resultats obtinguts amb el test ELISA comercial CCP3 en funció dels pèptids inclosos en l'assaig i del criteri de positivitat establert pel multiplex. El punt de tall per la positivitat de l'assaig CCP3 és de 20UA/mL; els sèrums amb valors iguals o superior són considerats seropositius. A) Resultats del multiplex que inclou 8 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 3 positius simultanis. B) Resultats del multiplex que inclou 5 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 3 positius simultanis. Els pèptids exclosos de l'assaig són CFFCP-1, CFFCP-2 i CFVCP. C) Resultats del multiplex que inclou 6 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 3 positius simultanis. Els pèptids exclosos són CFFCP-1 i CFFCP-2. D) Resultats del multiplex que inclou 8 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 2 positius simultanis. E) Resultats del multiplex que inclou 5 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 2 positius simultanis. Els pèptids exclosos de l'assaig són CFFCP-1, CFFCP-2 i CFVCP. F) Resultats del multiplex que inclou 6 pèptids de l'assaig, establint que el multiplex és positiu quan hi ha ≥ 2 positius simultanis. Els pèptids exclosos són CFFCP-1 i CFFCP-2.

1.6.4 Determinació de la sensibilitat i especificitat global del microarray

Els resultats mostrats en l'apartat anterior ens van servir per determinar el punt de tall de positivitat com a ≥ 3 pèptids positius simultanis. Amb aquest punt de tall es va determinar el resultat global de sensibilitat i especificitat del disseny multiplex en la mostra analitzada comparant els resultats obtinguts del grup d'AR vs el grup de BS i PsA. Un cop establert aquest paràmetre la conclusió va ser clara. Només en el grup de pacients d'AR es va mostrar una positivitat simultània de 3 pèptids o més. Es va detectar en 40 pacients, de tal manera que es va observar una sensibilitat del 61,4%. Tant en el grup de BS com el de PsA, no hi ha cap sèrum amb reactivitat envers 3 o més especificitats fines. Per tant, establint aquest punt de tall de positivitat, s'obté una especificitat del 100%.

En el grup de BS només hi ha 5 pacients que presenten positivitat en una de les especificitats fines analitzades i un únic cas on un sèrum es pot considerar positiu per dos pèptids de forma simultània. En el grup d'artritis psoriàsica els resultats són molt similars i només hi ha 3 casos on es detecta positivitat per dos dels antigens i 3 casos més on només es detecta positivitat respecte un pèptid. En la resta de sèrums no es detecta positivitat en cap antígen testat. En el grup d'AR hi ha 4 sèrums que han estat descartats per tots els pèptids d'anàlisi i dels quals no es disposa d'informació. En el grup de PsA i BS això no s'ha donat en cap cas (Taula 17).

Els patrons de reactivitat (Figura 33) confirmen la presència d'ACPAs que es detecten amb diferents especificitats fines de forma simultània en els pacients d'AR i que no són detectades en els grups emprats com a control. D'aquesta manera, amb aquest assaig es pot identificar una resposta específica dels ACPAs en el grup d'AR i determinar que aquesta resposta ACPA es dona envers la presència de múltiples epítops.

Nº pèptids positius al múltiplex	Artritis reumatoide	Banc de sang	Artritis psoriàsica
0	9 (12.9)	65 (92.9)	64 (91.4)
1 (+) o 2 (+)	14 (20)	5 (7.1)	6 (8.6)
≥ 3 (+)	43 (61.4)	0 (0)	0 (0)
Número de sèrums exclosos de l'assaig	4 (5.7)	0 (0)	0(0)
Total (%)	70 (100)	70 (100)	70 (100)

Taula 17: Relació de positivitats simultànies detectades envers les diferents especificitats fines incloses en el microarray en les diferents cohorts d'estudi. Entre parèntesis es mostra el percentatge respecte el total de la mostra.

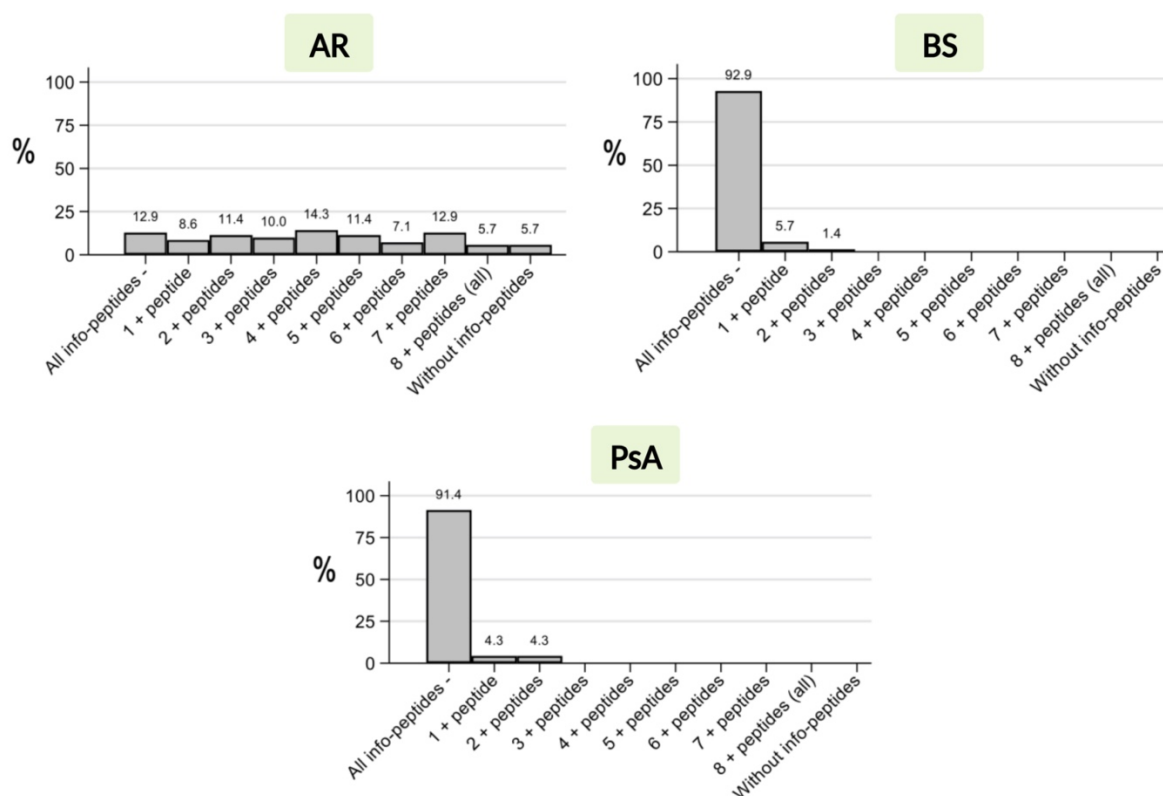


Figura 33: Patrons de reactivitat envers els 8 pèptids quimèrics citrul·linats inclosos en l'assaig del múltiplex en les tres cohorts d'estudi (AR, BS i PsA).

2. Pèptids quimèrics cíclics amb múltiples modificacions post-traduccionals com antígens per la detecció d'AMPAs en pacients d'artritis reumatoide greu

2.1 Optimització de la metodologia de l'ELISA

2.1.1 Comparació dels mètodes d'unió del pèptid a la placa d'ELISA

El primer pas de l'anàlisi inclòs en aquest apartat va consistir en la comparació de diferents mètodes d'unió d'un pèptid quimèric citrul·linat i cíclic de fibrina i filagrina (CFFCP-1) al suport de poliestirè de les plaques d'ELISA. Els dos mètodes d'unió comparats van ser per una banda l'ús de plaques Nunc Amino Immobilizer que presenten grups electròfils a la superfície adients per formar enllaços covalents amb el grup amino terminal del pèptid i d'altra banda l'ús de plaques MaxiSorp derivatitzades amb la proteïna anàloga de l'estreptavidina anomenada NeutrAvidin®, per formar una interacció biològica d'alta afinitat.

En el primer cas, el pèptid no va requerir cap modificació per ser presentat a la placa ja que la unió es dona mitjançant el grup α -amino de la seqüència peptídica. En canvi, per poder dur a terme la unió del pèptid a la NeutrAvidin®, es requereix que el pèptid estigui biotinitat. La biotinitació es va dur a terme mitjançant l'addició d'un grup N-Biotinyl-NH-(PEG)₂-COOH a l'extrem N-terminal del pèptid. Es va emprar aquest tipus de biotina ja presenta un espaiador de dos grups de polietilenglicol, el que facilita que es pugui donar una exposició adequada de la seqüència peptídica i per tant dels epítops que es pretenen presentar per la detecció d'anticossos. Amb aquesta metodologia, a més, es requereix una quantitat menor tant de pèptid, com de sèrum i d'anticossos secundaris per poder realitzar els assaigs amb unes condicions bones d'assaig/soroll de fons baix i un ratio alt de senyal/soroll.

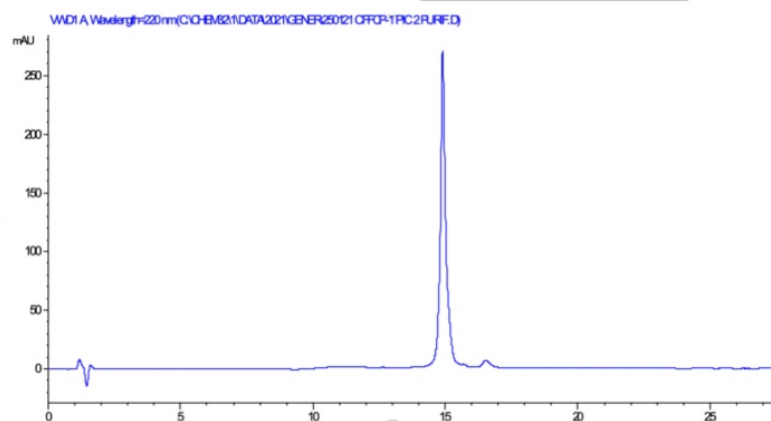
2.1.1.1 Síntesi i caracterització dels antígens peptídics

Tant la síntesi del pèptid CFFCP-1 com la del CFFCP-1 biotinitat s'havien donat de forma prèvia al laboratori. El pèptid Biotina-CFFCP-1 havia estat també prèviament purificat i caracteritzat, i es va incloure directament a l'assaig sense requerir cap pas addicional. En el cas del pèptid CFFCP-1, es disposava de la peptidil-resina. En aquest cas, per obtenir el pèptid en la seva forma ciclada i purificada, es va realitzar l'escissió del CFFCP-1 de la resina i posteriorment es va ciclar i purificar. L'anàlisi per HPLC a escala analítica (Figura 34) mostra un alt grau de puresa (>95%). El rendiment d'escissió del pèptid CFFCP-1 de la resina va ser del 62,3%, mentre que el rendiment de la ciclació

i posterior purificació va ser del 15%. El rendiment global de síntesi va ser del 9,4%. L'anàlisi per espectrometria de masses va confirmar la seva correcta identitat (Taula 18).

A) CFFCP-1

NH₂- HSTKRGHAKSRPV CitG-HQCHQEST CitGRSRGRRCGRSGS



B) Biotina-CFFCP-1

Biotinyl-PEG₂- HSTKRGHAKSRPV CitG-HQCHQEST CitGRSRGRRCGRSGS

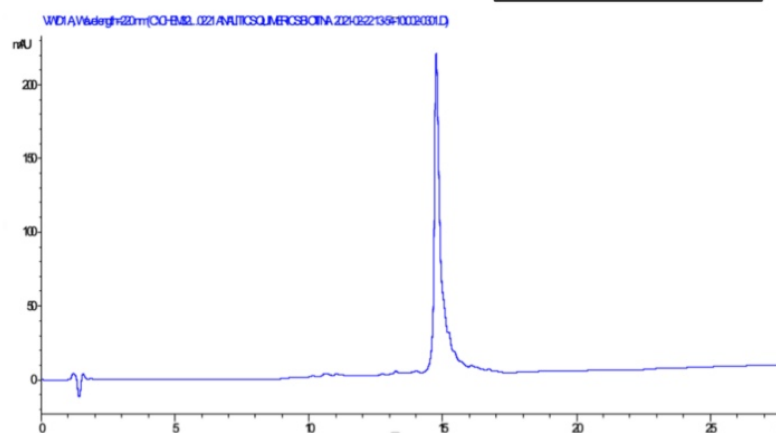


Figura 34: Seqüència aminoàcida i espectre d'HPLC analític de cadascun dels pèptids confirmant un >95% de puresa. (A) Seqüència aminoàcida del pèptid CFFCP-1 i cromatograma d'HPLC a escala analítica obtingut amb el gradient lineal 1-25% de solvent B (ACN + 0,05% TFA) en solvent A (H₂O + 0,05% de TFA) durant 20 minuts a un flux d'1mL/min, després d'un isocràtic de 5 minuts al 1% de solvent B. (B) Seqüència aminoàcida del pèptid CFFCP-1 biotinitat i cromatograma d'HPLC a escala analítica obtingut amb el gradient lineal 5-95% de solvent B (ACN + 0,05% TFA) en solvent A (H₂O + 0,05% de TFA) durant 20 minuts a un flux d'1mL/min, després d'un isocràtic de 5 minuts al 5 de solvent B.

	CFFCP-1		Biotina-CFFCP-1	
	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental
[M+3H] ⁺³	1333,47	1333,32	-	-
[M+4H] ⁺⁴	1000,35	999,99	1136,01	1136,06
[M+5H] ⁺⁵	800,48	800,39	909,01	909,25
[M+6H] ⁺⁶	667,24	666,99	757,67	757,37
[M+7H] ⁺⁷	572,06	571,85	649,58	649,45
[M+8H] ⁺⁸	500,68	500,37	568,51	568,15

Taula 18: Relacions m/z teòriques i experimentals dels dos pèptids emprats en l'assaig de comparació dels mètodes d'unió a la placa d'ELISA.

2.1.1.2 Assaig comparatiu dels dos mètodes d'ELISA

Per determinar quin dels dos millors mètodes d'unió a la placa donaven millor resultat en termes de reproduïbilitat, es van calcular els coeficients de variació intra-placa i inter-placa. A nivell experimental l'assaig va consistir en l'anàlisi de 40 sèrums d'AR per duplicat en la mateixa placa dies diferents. Aquestes anàlisis ens van permetre determinar els coeficients de variabilitat intra-assaig i inter-assaig.

La mitjana + l'error estàndard de la mitjana calculat pel pèptid biotinitat en la comparació intra-assaig era de $3,7 \pm 0,4$ i la inter-assaig era de $12,7 \pm 2,1$. Els resultats obtinguts amb el pèptid no biotinitat van mostrar coeficients de variació més alts tant intra-assaig ($9,9 \pm 1,0$) com inter-assaig ($32,5 \pm 3,8$). La comparació dels valors dels coeficients de variació dels dos grups va confirmar la presència de diferències estadísticament significatives ($p < 0.0001$) tant intra-assaig com inter-assaig (Figura 35). D'acord amb criteris prèviament establerts^{353,354} que parlen d'un màxim de CV intra-assaig i inter-assaig d'entre el 15 i el 20%, i en vista dels resultats obtinguts en la comparativa, es va decidir treballar amb el protocol d'unió biotina-NeutrAvidin®. En conseqüència tots els pèptids que es van sintetitzar i emprar en l'anàlisi en passos posteriors, van ser biotinitats.

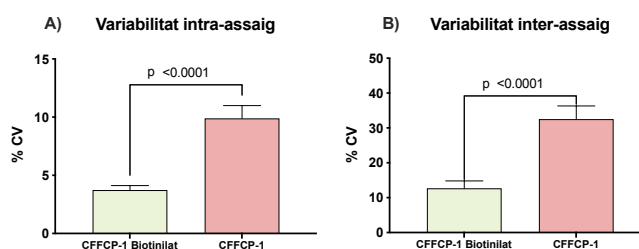


Figura 35: Comparació de la variabilitat intra-assaig (A) i inter-assaig (B) obtinguda amb els assaigs fets amb les dues condicions d'unió del pèptid a la placa.

2.2 Síntesi de pèptids quimèrics homocitrul·linats i citrul·linats

2.2.1 Síntesi i caracterització dels antígens peptídics

En base a l'estructura quimèrica del pèptid CFFCP-1, que havia estat àmpliament estudiat i caracteritzat en assaigs previs del nostre grup, es va decidir dissenyar i sintetitzar tres noves estructures que combinen la presència d'homocitrul·lina i citrul·lina en la seva estructura de forma simultània. Les homocitrul·lines es van introduir en el fragment corresponent a la α -fibrina (617-631), més concretament a les posicions 620 i/o 625 on a la seqüència nativa hi hauria una lisina (Taula 19). En els tres casos es va incorporar durant el procés de síntesi el grup N-Biotinil-NH-(PEG)₂-COOH a l'extrem N-terminal dels pèptids. Una vegada acabada la síntesi i dut a terme el desancoratge de la resina, es va induir la formació d'un pont disulfur mitjançant l'eliminació dels grups protectors AcM i l'oxidació dels residus de cisteïna presents a la seqüència del domini de la filagrina. De forma paral·lela també es va obtenir l'estructura control corresponent a aquests pèptids, anomenada CFFCP-R i que presenta arginines en les posicions on els tres antígens presenten PTMs.

De forma anàloga a com s'havia fet amb el pèptid CFFCP-1, es van purificar les diferents molècules peptídiques i en tots els casos es van obtenir amb un grau de puresa >95% (Figura 36). Els rendiments de l'escissió de cadascun dels pèptids de la matriu polimèrica insoluble, del procediment de ciclació i purificació i el rendiment global de la síntesi estan indicats a la Taula 19. Es va confirmar la correcta identificació de la molècula per espectrometria de masses (Taula 20).

Pèptid	Estructura	R _{esc}	R _{cic+pur}	R _{sin}
Biotina-CFFCHP-1	Biotinyl-PEG ₂ - HSTKRGHAhCitSRPVcItG-HQCHQESTCItGRSRGRCGRSGS	57,1	20,0	11,4
Biotina-CFFCHP-2	Biotinyl-PEG ₂ - HSThCitSRGHAKSRPVcItG-HQCHQESTCItGRSRGRCGRSGS	50,1	23,7	11,8
Biotina-CFFCHP-3	Biotinyl-PEG ₂ - HSThCitSRGHAhCitSRPVcItGHQCHQESTCItGRSRGRCGRSGS	55,7	24,6	13,7
Biotina-CFFCP-R	Biotinyl-PEG ₂ - HSTKRGHAKSRPVRG-HQCHQESTRGRSRGRCGRSGS	43,4	16,0	7,0

Taula 19: Seqüències aminoacídiques, rendiment d'escissió (R_{esc}), rendiment de ciclació + purificació (R_{cic+pur}) i rendiment de síntesi (R_{sin}) dels tres pèptids citrul·linats/homocitrul·linats. Els valors que fan referència al resultat de cadascun dels tres rendiments (escissió, ciclació + purificació i síntesi) s'expressen en %.

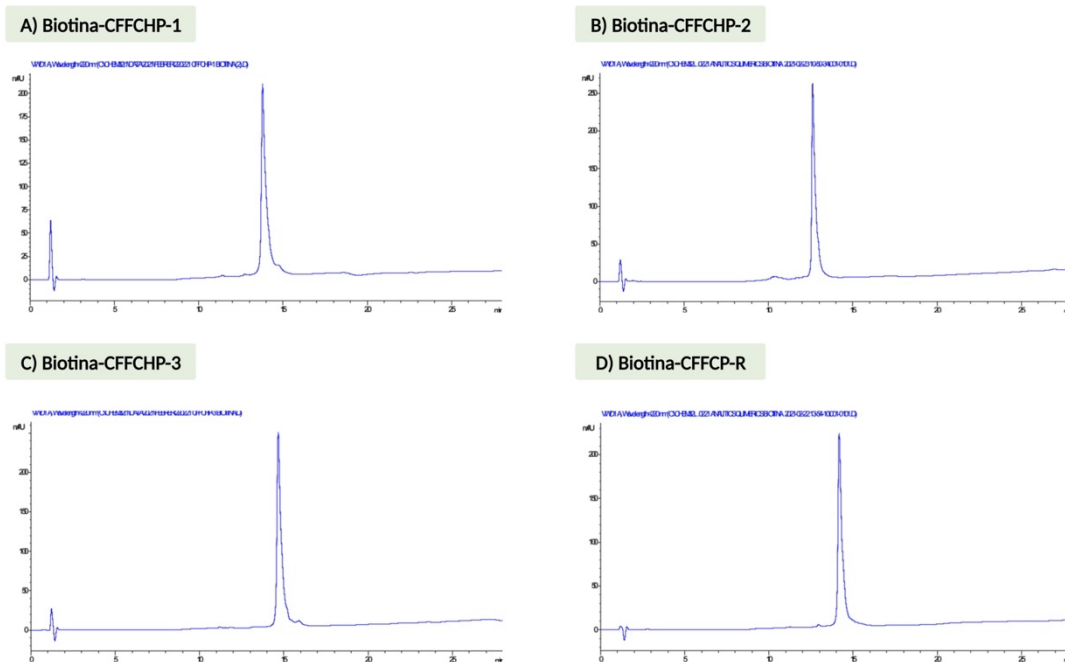


Figura 36: Espectre d’HPLC analític de cadascun dels pèptids confirmant un >95% de puresa. Espectres obtinguts amb el gradient lineal 5-95% de solvent B (ACN + 0,05% TFA) en solvent A (H₂O + 0,05% de TFA) durant 20 minuts a un flux d’1mL/min, després d’un isocràtic de 5 minuts al 5 de solvent B. (A) Cromatograma d’HPLC a escala analítica del pèptid Biotina-CFFCHP-1. (B) Cromatograma d’HPLC a escala analítica del pèptid Biotina-CFFCHP-2. (C) Cromatograma d’HPLC a escala analítica del pèptid Biotina-CFFCHP-3. (D) Cromatograma d’HPLC a escala analítica del pèptid Biotina-CFFCP-R.

	Biotina-CFFCHP-1		Biotina-CFFCHP-2		Biotina-CFFCHP-3		Biotina-CFFCP-R	
	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental
[M+4H] ⁺⁴	1146,52	1146,79	1146,52	1146,57	1157,27	1157,59	1135,52	1135,32
[M+5H] ⁺⁵	917,42	917,50	917,42	917,25	926,02	926,14	908,61	908,46
[M+6H] ⁺⁶	764,68	764,86	764,68	764,53	771,85	772,02	757,35	757,04
[M+7H] ⁺⁷	655,58	655,74	655,58	655,46	661,73	661,88	649,30	649,17
[M+8H] ⁺⁸	573,76	573,90	573,76	573,53	579,14	579,3	568,26	568,03

Taula 20: Relació de m/z teòriques i experimentals dels diferents pèptids químics inclosos a l’assaig.

2.2.2 Assaig de detecció d'AMPA emprant els tres antígens peptídics

Els pèptids quimèrics cíclics citrul·linats (Biotina-CFFCP-1) i els pèptids homocitrul·linats/citrul·linats (Biotina-CFFCHP-1, Biotina-CFFCHP-2, Biotina-CFFCHP-3), així com el seu respectiu pèptid control (Biotina-CFFCP-R) van ser inclosos en assaigs de tipus ELISA amb una unió del pèptid biotinilat a la NeutrAvidin® de la placa derivatitzada. Es van testar 178 sèrums de pacients de RA establerta i 120 mostres de donants del banc de sang, que van ser emprades com a mostres control. En aquest cas, les anàlisis es van dur a terme amb 3 isotips diferents: IgG, IgA i IgM. Amb la representació de les corbes ROC (Figura 37) a partir de la resposta dels dos grups d'anàlisi es va poder determinar el punt de tall de cada antigen peptídic/isotip i determinar la sensibilitat a una especificitat fixada al 95%. Donat que per dur a terme aquestes anàlisis, només es va treballar amb la versió biotinilada de cadascun dels pèptids, per simplicitat a l'hora de descriure la resposta anti-AMPA detectada amb cadascun d'ells, aquesta és identificada simplement amb el nom de l'antigen corresponent, sense fer menció específica a la presència de biotina. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 21.

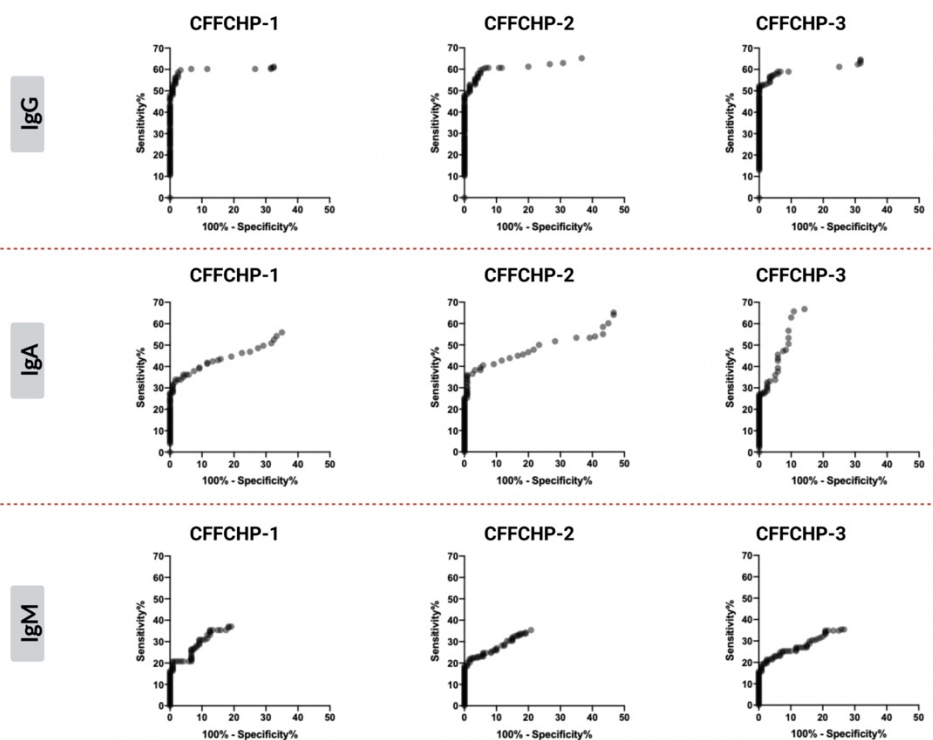


Figura 37: Representació de les corbes ROC obtingudes amb els tres isotips d'estudi amb els antígens peptídics que combinen citrul·lina i homocitrul·lina. La distribució de les corbes ROC representades es distribueix de la següent manera: primera fila es correspon a l'isotip IgG, la segona fila es correspon a l'isotip IgA i la tercera fila es correspon a l'isotip IgM. La distribució mostra els resultats obtinguts del pèptid Biotina-CFFCHP-1 a la primera columna, els del pèptid Biotina-CFFCHP-2 a la segona columna i els del pèptid Biotina-CFFCHP-3 a la tercera columna.

	Punt de tall (UA/mL)		
	IgG	IgA	IgM
Anti-CFFCP-1	≥11,5	≥8,5	≥55,0
Anti-CFFCHP-1	≥18,0	≥20,5	≥52,5
Anti-CFFCHP-2	≥15,0	≥21,5	≥60,0
Anti-CFFCHP-3	≥17,5	≥26,5	≥84,5

Taula 21: Valors del punt de tall determinat per cada antigen amb una especificitat del 95%. Els valors s'han calculat fent la comparació dels resultats obtinguts en la població d'AR (n=178) vs la població control provinent de mostres del banc de sang (n=120).

La distribució de la resposta anti-AMPA (anti-CFFCHP-1, anti-CFFCHP-2 i anti-CFFCHP-3) i anti-ACPA (anti-CFFCP-1) s'ha analitzat pels 3 isotips d'estudi. Els resultats van confirmar que l'isotip més rellevant en la resposta tant anti-ACPA com anti-AMPA d'aquests pacients era l'IgG. Per aquest isotip, la proporció de pacients que van mostrar resposta anti-ACPA és del 56,7% mentre que la positivitat per les 3 especificitats fines anti-AMPA presenta valors propers (de 58,4% anti-CFFCHP-1, 57,8% anti-CFFCHP-2 i 57,3% anti-CFFCHP-3).

En l'isotip IgA, en canvi, es van observar nivells lleugerament més alts de positivitat (36%, 39,3% i 36% respectivament) en les respostes anti-AMPA amb les 3 especificitats fines que presenten una estructura amb citrul·lines i homocitrul·lines que en la resposta anti-ACPA determinada per la resposta al pèptid CFFCP-1 (33,7%).

Per l'isotip IgM es van obtenir resultats similars en termes de positivitat per les quatre especificitats fines analitzades. Es va observar una resposta anti-AMPA en 21,3% dels pacients quan es va testar amb el pèptid CFFCHP-1 i aquesta va augmentar lleugerament quan l'antigen emprat va ser el pèptid CFFCHP-2 o CFFCHP-3, on es va observar una resposta positiva en el 23% dels pacients. La positivitat i els nivells medians d'AMPA detectats amb cada pèptid/isotip es mostren a la Taula 22.

Població d'AR (n=178)	α-IgG	α-IgA	α-IgM
Positivitat (%) anti-CFFCP-1	101 (56,7)	60 (33,7)	40 (22,5)
Mediana dels nivells anti-CFFCP-1 (IQR)	45 (456)	0 (55)	0 (48)
Positivitat (%) anti-CFFCHP-1	104 (58,4)	64 (36,0)	37 (21,3)
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR)	55 (469)	6 (52)	0 (40)
Positivitat (%) anti-CFFCHP-2	103 (57,8)	70 (39,3)	41 (23,0)
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR)	52 (590)	12 (66)	0 (52)
Positivitat (%) anti-CFFCHP-3	102 (57,3)	64 (36,0)	41 (23,0)
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR)	69 (503)	18 (54)	0 (73)

Taula 22: Resum de la resposta anti-ACPA i anti-AMPA observada en la població d'AR (n=178). En els resultats que fan referència a la positivitat, el primer nombre fa referència al nombre absolut de pacients positiu de la població mentre que entre parèntesis s'indica el percentatge de la població al que correspon. Pel que fa a la mediana dels nivells, s'expressa en nombre absoluts el valor de la mediana i entre parèntesis es fa referència als valors corresponents al rang interquartílic de la mostra.

2.3 Resposta AMPA i relació amb la malaltia pulmonar intersticial

En base a resultats recentment publicats pel nostre grup en el que es va trobar una relació estadísticament significativa entre la resposta anti-CarP en pacients d'AR i la presència d'una manifestació extra-articular, amb una alta mortalitat, com és la malaltia pulmonar intersticial¹²⁵, es va dividir la cohort d'AR (n=178) en dos grups de pacients diferents – els que presenten aquesta afectació pulmonar i els que no la pateixen. Així doncs es van establir dos grups d'anàlisi per la seva comparació que van consistir en 37 pacients AR-ILD i 141 pacients que només presenten AR (sense ILD, AR-no ILD).

En dur a terme la comparativa entre la resposta anti-AMPA i anti-ACPA pels 3 isotips en els dos subgrups dins la cohort d'AR, es va trobar també una diferència significativa entre els dos grups amb les especificitats fines que contenen tant homocitrul·lina com citrul·lina, i que per tant inclourien la resposta anti-CarP. La resposta AMPA amb les 3 especificitats era més freqüent en el grup d'AR-ILD i els nivells d'anticossos observats també eren més alts en el grup d'AR-ILD. Les diferències eren estadísticament significatives per la resposta AMPA dels isotips IgA i IgM, i va destacar la diferència observada quan l'anàlisi es duia a terme amb l'especificitat fina CFFCHP-1, sobretot en l'isotip IgA (Figura 38).

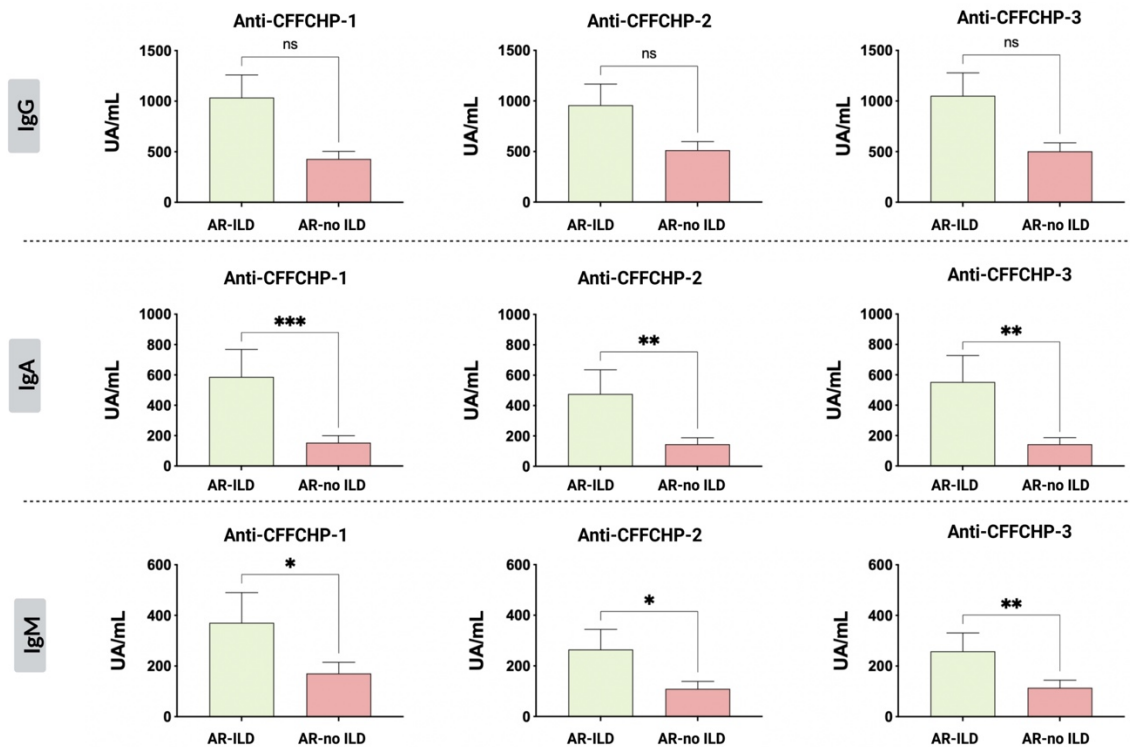


Figura 38: Comparació dels resultats obtinguts en la cohort d'AR-ILD (n=37) vs AR-no ILD (n=141) pels isotips IgG (primera fila), IgA (segona fila) i IgM (tercera fila). Es considera estadísticament significatiu quan el p-valor < 0,05. Quan aquest valor no és significatiu, al gràfic s'indica amb les inicials ns. * indica p < 0,05, ** indica p < 0,01 i *** indica p < 0,001.

2.4 Síntesi de diferents fragments de fibrina amb noves combinacions de modificacions post-traduccionals

Degut a que l'AR-ILD ha estat associada amb la presència d'autoanticòs anti-CarP, amb l'objectiu d'estudiar la contribució d'altres respostes AMPA, vam decidir sintetitzar un pèptid cíclic quimèric de fibrina i filagrina que inclogués les tres modificacions post-traduccionals de forma simultània, citrul·linació, homocitrul·linació i acetilació.

Abans de dur a terme la síntesi d'aquest pèptid, i amb l'objectiu d'optimitzar el disseny de l'estructura peptídica que finalment seria emprada com antígen, es va realitzar un estudi preliminar en el qual es van sintetitzar una sèrie de 10 pèptids basats en el domini α -fibrina (617-631), biotinilats en el seu extrem α -amino, en els quals es van afegir diferents combinacions de PTMs, i també un pèptid control en el qual no hi havia cap PTM. En aquest estudi preliminar realitzat es va treballar només amb aquest domini per agilitzar-ne la síntesi.

El disseny dels 11 pèptids analitzats va consistir en l'ús de la base del domini ja esmentat, sobre la qual, en 9 d'ells es van introduir diferents combinacions de PTMs introduïdes en els aminoàcids

susceptibles a patir-les de forma natural. És a dir, es van introduir citrul·lines en posició d'arginina i homocitrul·lines/acetil lisina en la posició de la lisina. El desè pèptid amb PTMs (Pèptid 11) va ser dissenyat en base a l'estructura del pèptid CFFCHP-1, ja que aquest era el que havia mostrat diferències més grans entre el grup AR-ILD vs AR-no-ILD en la detecció d'AMPA-IgA. En el P11 es va mantenir la posició de la homocitrul·lina i de la citrul·lina i només es va afegir l'acetil lisina en la lisina que estava disponible. L'onzè pèptid és el control (P1).

D'entre els 10 pèptids, n'hi havia 3 que contenen les 3PTMs de forma simultània. Aquests tres (P9, P10 i P11) van ser els determinants per l'elecció del domini que havia d'incloure el futur pèptid quimèric. La resta de pèptids van permetre confirmar si existia una resposta AMPA detectable de forma independent de la presència de citrul·lina. Això era important per poder determinar de forma empírica el valor afegit d'incloure cadascuna de les PTMs.

La síntesi dels 11 pèptids es va donar de forma exitosa. El llistat de les seqüències d'aminoàcids, en el que es mostren les diferents combinacions de PTMs incloses i la seva posició en l'estructura, els rendiments d'escissió de la resina, de purificació i el rendiment global de la síntesi estan indicats a la Taula 23.

Pèptid	Modificacions	Estructura	R _{esc}	R _{pur}	R _{sín}
Biotina-P1	Pèptid control	Biotinyl-PEG ₂ -HSTKRGHAKSRPVRG	72,0	49,1	35,4
Biotina-P2	Citrul·lina	Biotinyl-PEG ₂ -HSTKCitGHAKSRPVCitG	82,3	52,4	43,4
Biotina-P3	Homocitrul·lina	Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitRGHAhCitSRPVRG	91,2	43,8	40,2
Biotina-P4	Acetil lisina	Biotinyl-PEG ₂ -HSTK(Ac)RGHAK(Ac)SRPVRG	96	31,0	29,7
Biotina-P5	Cit/hCit	Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitCitGHAhCitSRPVCitG	93,2	57,8	53,9
Biotina-P6	K(Ac)/Cit	Biotinyl-PEG ₂ -HSTK(Ac)CitGHAK(Ac)SRPVCitG	94,9	57,2	54,2
Biotina-P7	K(Ac)/hCit	Biotinyl-PEG ₂ -HSTK(Ac)RGHAhCitSRPVRG	84,7	50,1	42,4
Biotina-P8	hCit/K(Ac)	Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitRGHAK(Ac)SRPVRG	90,3	42,7	38,6
Biotina-P9	K(Ac)/Cit/hCit	Biotinyl-PEG ₂ -HSTK(Ac)CitGHAhCitSRPVCitG	89,3	66,3	59,2
Biotina-P10	hCit/Cit/K(Ac)	Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitCitGHAK(Ac)SRPVCitG	91,1	57,2	52,1
Biotina-P11	K(Ac)/hCit/Cit	Biotinyl-PEG ₂ -HSTK(Ac)RGHAhCitSRPVCitG	90,2	55,5	50,1

Taula 23: Seqüències primàries de les diferents versions del pèptid d' α -fibrina (617-631) amb PTMs, i rendiments d'escissió, purificació i síntesi. El pèptid P1 es correspon al fragment d' α -fibrina (617-631) en la seva forma nativa i correspon al pèptid control de l'assaig. Els pèptids P2-P4 inclouen una única PTM (citrul·linació (Cit), homocitrul·linació (hCit) o acetilació (K(Ac))). Del P5 al P8 són pèptids que combinen la presència de 2 PTMs de forma simultània. Del P9 al P11 són pèptids que combinen la presència de 3 PTMs de forma simultània.

Un cop finalitzada la síntesi es va dur a terme la caracterització mitjançant HPLC a escala analítica i espectrometria de masses. La relació de masses esperades i obtingudes de cadascun dels pèptids es detalla a la Taula 24. En tots els casos es va confirmar una puresa superior al 95%.

	Biotina-P1		Biotina-P2		Biotina-P3		Biotina-P4	
	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental
[M+2H] ⁺²	1109,29	1109,07	1110,27	1109,75	1152,32	1151,45	1151,32	1150,57
[M+3H] ⁺³	739,86	729,32	740,52	740,16	768,55	768,17	767,88	767,49
[M+4H] ⁺⁴	555,15	554,94	555,64	555,41	576,66	576,40	576,16	575,93
[M+5H] ⁺⁵	444,32	444,23	444,72	-	461,53	-	461,17	-

	Biotina-P5		Biotina-P6		Biotina-P7		Biotina-P8	
	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental
[M+2H] ⁺²	1153,30	1152,73	1152,31	1151,66	1151,82	1151,25	1151,82	1151,18
[M+3H] ⁺³	769,20	768,85	768,54	768,24	768,22	767,83	768,22	767,83
[M+4H] ⁺⁴	577,15	576,80	576,66	576,40	576,42	576,13	576,42	576,13
[M+5H] ⁺⁵	461,92	-	461,53	-	461,33	461,09	461,33	461,30

	Biotina-P9		Biotina-P10		Biotina-P11	
	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental	m/z teòriques	m/z experimental
[M+2H] ⁺²	1152,80	1152,13	1152,80	1152,26	1151,84	1151,72
[M+3H] ⁺³	768,87	768,51	768,87	768,57	768,23	768,24
[M+4H] ⁺⁴	576,90	576,67	576,90	576,68	576,42	576,47
[M+5H] ⁺⁵	461,73	-	461,73	-	461,34	-

Taula 24: Relació de m/z esperades i obtingudes dels diferents pèptids derivats d'α-fibrina (617-631).

Com que la finalitat experimental d'aquest estudi era fer un screening per a decidir la posició d'acetilació en la seqüència només es va treballar amb sèrums de pacients d'AR i es va analitzar l'isotip IgG, ja que es tracta de l'isotip majoritari. Els estudis a cada placa van incloure controls positius i negatius.

En aquest assaig preliminar es va decidir testar també la reactivitat de la barreja física dels pèptids i comparar-la a la reactivitat individual detectada amb cadascun dels pèptids, per poder comprovar, tal i com s'ha descrit prèviament ²¹⁶, que l'exposició dels antígens es pot veure

afectada i acabar generant resultats diferents, que afecten a la sensibilitat de l'assaig. L'anàlisi de la reactivitat de cada pèptid es va dur a terme després de restar-ne la reactivitat al pèptid control.

Els resultats obtinguts i representats en format de mapa de calor amb els tres pèptids que presenten una única modificació (Figura 39) van mostrar clarament diferències de reactivitat que van en línia amb les observacions prèvies on es demostra que la citrul·linació és la PTM més rellevant, i conseqüentment aquella on s'observa una major reactivitat. Tot i així, també cal destacar la presència de sèrums que no mostren reactivitat o aquesta és molt baixa cap al pèptid citrul·linat i en canvi si que presenten una resposta vers les estructures que només presenten modificacions a la lisina (homocitrul·lina o acetil lisina), com el cas dels sèrums 7, 97 o 186. Aquest resultat dóna suport a les hipòtesis que investiguen aquestes modificacions com a rellevants en el context de l'AR amb independència de la citrul·linació.

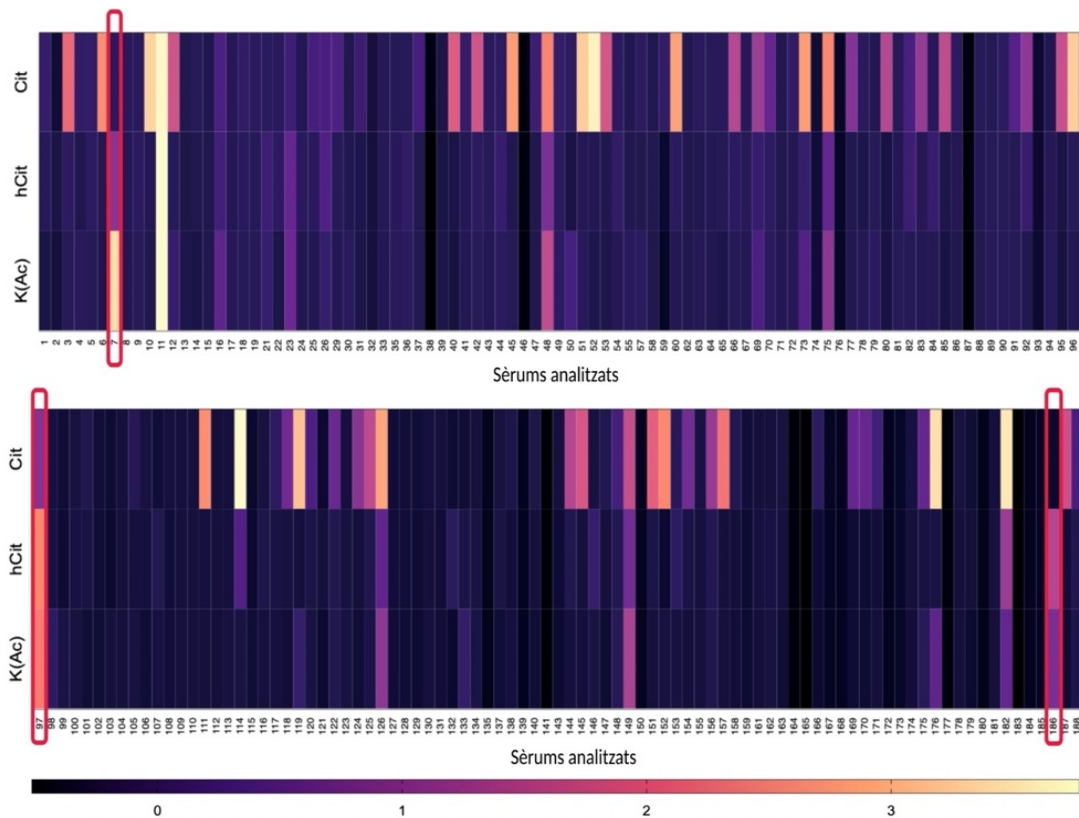


Figura 39: Mapa de calor de la reactivitat observada en unitats de densitat òptica dels 178 sèrums testats amb els 3 pèptids que presenten 1 PTM. Es mostra la reactivitat en front al pèptid citrul·linat (Cit), pèptid homocitrul·linat (hCit) i pèptid amb acetil lisina (K(Ac)). Es remarquen amb un quadre vermell els tres casos de sèrums mencionats en el que es mostra que hi ha resposta anti-CarP i AAPA però no es detecta resposta ACPA o aquesta és molt baixa.

Es va dur a terme l'anàlisi comparatiu de la resta de pèptids amb diferents combinacions de PTMs per determinar si hi havia i quina seria, a priori, una combinació que ens permetés detectar una major reactivitat, i per tant, resposta AMPA. En aquesta comparativa es va incloure també l'opció de fer la barreja física dels diferents antígens. Els resultats es mostren novament en forma de mapa de calor, amb el color canviant en funció de la reactivitat observada (Figura 40).

La comparativa dels 10 pèptids que presenten 1 o més PTMs van reafirmar que la presència de citrul·lina és un element clau, ja que els pèptids que la contenen (P5, P9, P10 i P11) són els que mostren una major resposta. Els pèptids amb 3 PTMs (P9, P10 i P11) van detectar una resposta AMPA més alta que el pèptid 5 en algun sèrum (per exemple, el 110). Aquest resultat podria tenir relació amb la detecció d'una resposta AAPA. Aquesta resposta AMPA independent d'ACPA es confirma també en la reactivitat observada en front als pèptids 7 i 8 (combinació d'homocitrul·lina/acetil lisina) que presenta algun pacient, com és el cas del sèrum 186. Vist el valor que aporta cada PTM, sembla que els pèptids que combinen les 3 seran útils en la detecció una resposta més àmplia.

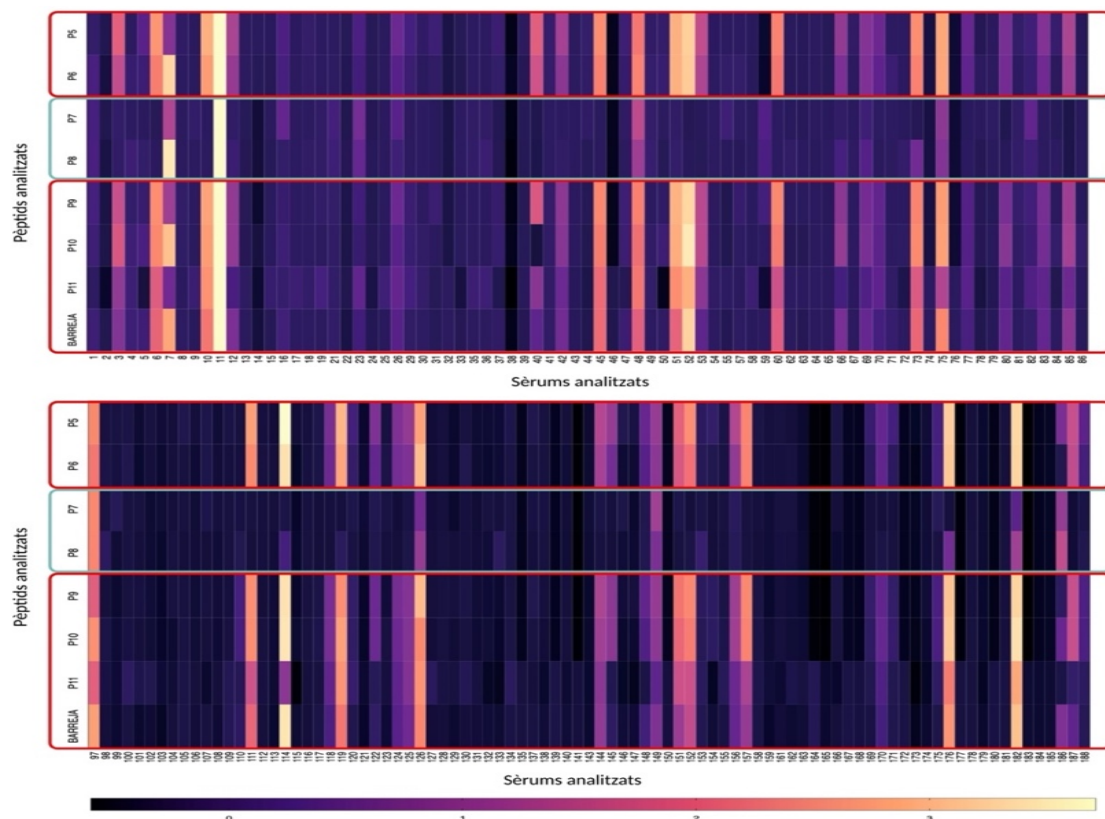


Figura 40: Mapa de calor de la reactivitat observada en unitats de densitat òptica dels 178 sèrums testats amb la resta de pèptids amb múltiples PTMs. S'enquadren en vermell els pèptids que contenen citrul·lina en la seva estructura (P5, P6, P9, P10 i la barreja física de pèptids) i en verd els que no contenen citrul·lina (P7 i P8).

La comparació de la reactivitat mitjana dels pèptids 9, 10 i el P11, els tres pèptids que inclouen les 3 PTMs, va mostrar resultats similars. Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la barreja física en comparació amb els pèptids individuals, va permetre confirmar que la reactivitat observada era menor, fet que confirma la importància de presentar els diferents pèptids en forma de seqüències quimèriques.

La conclusió de l'estudi preliminar va ser que l'ús de qualsevol de les tres combinacions de PTMs que donaven lloc als pèptids 9, 10 i 11 eren vàlides per ser incorporades en un pèptid quimèric de fibrina i filagrina per dur a terme l'estudi de la resposta AMPA en front les tres modificacions.

2.5 Síntesi d'un pèptid quimèric triplement modificat

Tenint en compte els resultats presentats en l'apartat 2.4, en els quals es mostrava que no hi havia diferències significatives entre les tres estructures que contenien les 3 PTMs en posicions diferents, ens vam decantar per l'ús de la seqüència base del pèptid 11 com a domini α -fibrina del pèptid quimèric. Es va considerar la millor opció ja que era el pèptid curt que s'havia basat en l'estructura del pèptid CFFCHP-1, que com s'ha vist en l'apartat 2.3, és el pèptid que ha mostrat unes diferències significatives més grans entre AR-ILD i AR-no ILD a l'isotip IgA (Apartat 2.3).

El nou antigen va ser un pèptid quimèric cíclic de fibrina i filagrina cíclic citrul·linat, homocitrul·linat i acetilat, que va rebre el nom, en anglès, de *cyclic fibrin filaggrin citrullinated homocitrullinated acetylated peptide* (CFFCHAP). Manté una homocitrul·lina a la posició 625 i la citrul·lina a la posició 630 del domini α -fibrina (617-631) però incorpora una lisina acetilada a la posició 620. El pèptid es va sintetitzar i biotinilar en l'extrem N-terminal en fase sòlida, seguint el protocol descrit al capítol de Materials i Mètodes (Apartat 1.1.5) i es va ciclar de forma anàloga a com s'havia fet en els altres pèptids. La purificació del pèptid va permetre obtenir-lo amb una puresa major del 95%. El rendiment d'escissió de la resina va ser del 62%, mentre que el de ciclació i purificació va ser del 22,7%. El rendiment global de síntesi va ser del 14%. L'estructura primària, caracterització per HPLC i espectrometria de masses es mostren a la Figura 41.

Biotina - CFFCHAP

Biotinyl-PEG₂- HSTK(Ac)RGHAhCitSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRGRSGS

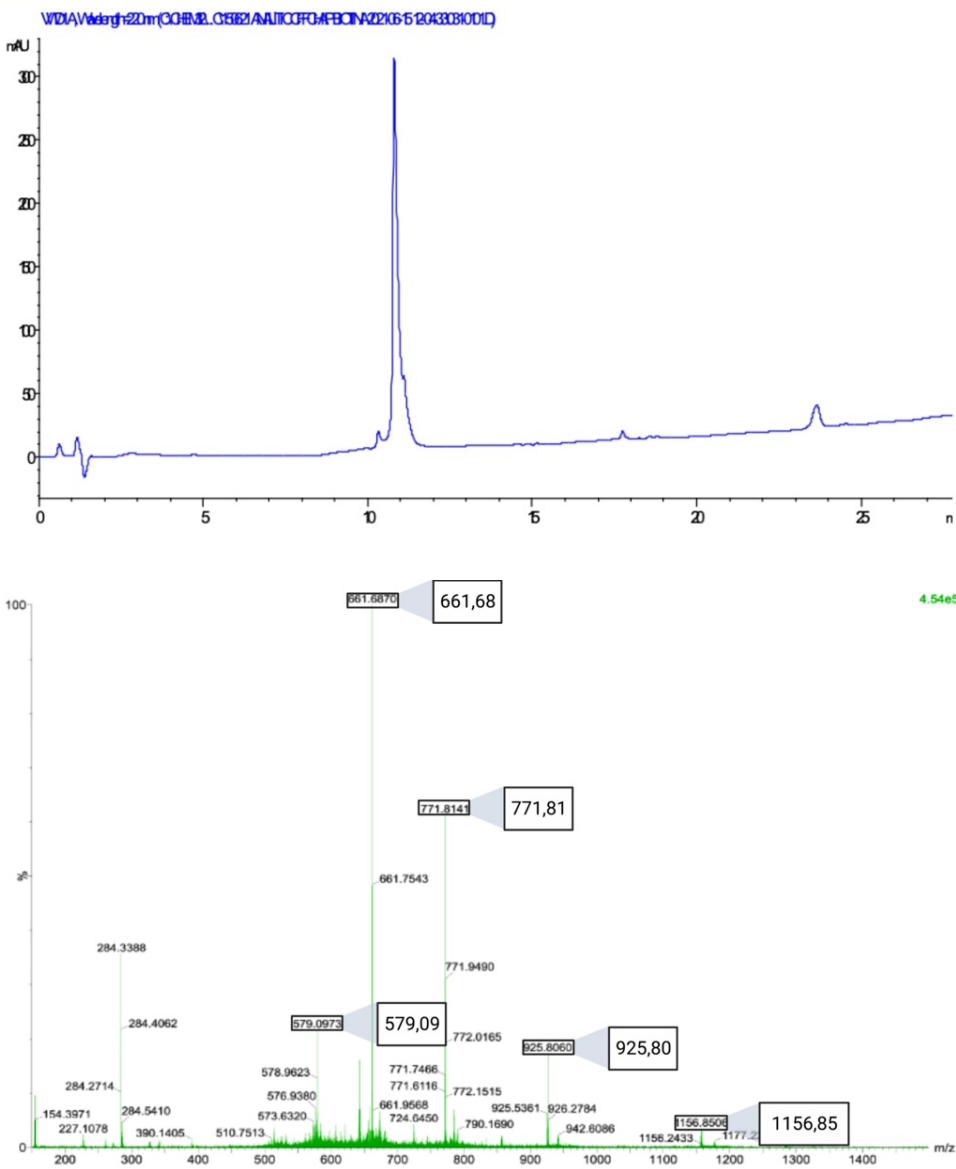


Figura 41: Caracterització per HPLC i espectrometria de masses del pèptid CFFCHAP. (a) Caracterització de l'elució del pèptid CFFCHAP per HPLC a escala analítica. Espectre obtingut amb el gradient lineal 5-95% de solvent B (ACN + 0,05% TFA) en solvent A (H₂O + 0,05% de TFA) durant 20 minuts a un flux d'1mL/min, després d'un isocràtic de 5 minuts al 5 de solvent B. (B) Espectre de masses registrat en mode d'ió positiu en un rang de m/z de 100-1500. La relació de m/z calculades teòricament són les següents: [M+4H]⁴⁺=1157,27, [M+5H]⁵⁺=926,02; [M+6H]⁶⁺=771,85; [M+7H]⁷⁺=661,73; [M+8H]⁸⁺=579,14. Les masses experimentals coincideixen amb les esperades i les relacions m/z obtingudes són les següents: [M+4H]⁴⁺=1156,85, [M+5H]⁵⁺=925,80; [M+6H]⁶⁺=771,81; [M+7H]⁷⁺=661,68; [M+8H]⁸⁺=579,09.

2.5.1 Estudi de la resposta AMPA a CFFCHAP i relació amb la malaltia pulmonar intersticial

Un cop dissenyat, sintetitzat i caracteritzat aquest nou pèptid triplement modificat CFFCHAP, es va emprar com antigen per tal de caracteritzar la resposta AMPA a la mateixa població estudiada amb les altres especificitats fines. L'estudi comparatiu de la resposta en els 178 pacients d'AR vs 120 mostres de donants de banc de sang va permetre fer el càlcul del punt de tall per determinar la positivitat de la resposta AMPA. Com es va fer amb els altres pèptids, es va determinar el punt de tall a una especificitat del 95% mitjançant la representació de corbes ROC per cadascun dels isotips (Figura 42). Els punts de tall de positivitat per el pèptid CFFCHAP van ser de $\geq 19,5$ per l'isotip IgG, $\geq 25,5$ a l'isotip IgA i $\geq 42,5$ a l'isotip IgM.

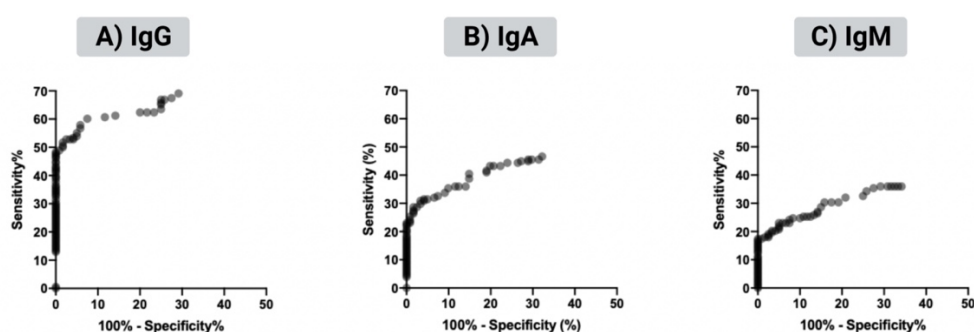


Figura 42: Representació de les corbes ROC obtingudes amb els tres isotips d'estudi amb l'antigen peptídic CFFCHAP. (A) IgG, (B) IgA i (C) IgM.

Per aquest pèptid també es va dur a terme la comparativa entre els nivells AMPA obtinguts en els grups d'AR-ILD i AR no-ILD i es van obtenir resultats similars als obtinguts amb les 3 especificitats fines doblement modificades (Taula 25). En aquest cas, però, les diferències a més de ser estadísticament significatives per els isotips IgA i IgM, també van resultar estadísticament significatives per l'isotip IgG (Figura 43).

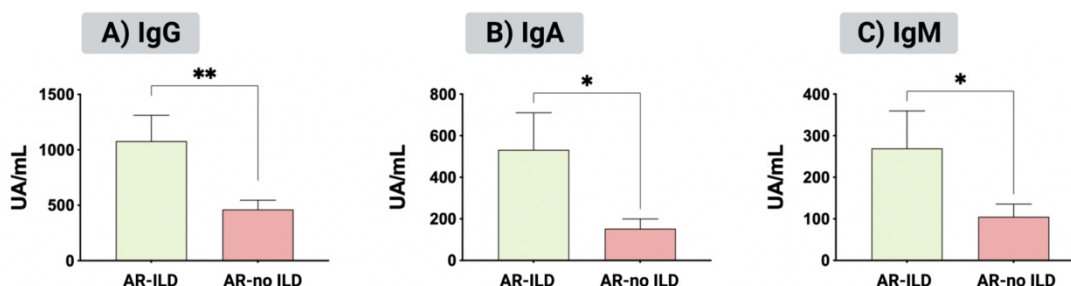


Figura 43: Comparació dels nivells de la resposta anti-AMPA vers l'especificitat fina CFFCHAP del grup de pacients d'AR-ILD i dels pacients d'AR sense ILD. (A) Comparació dels nivells de l'isotip IgG. (B) Comparació dels nivells de l'isotip IgA. (C) Comparació dels nivells de l'isotip IgM. En tots els casos s'observen diferències significatives. * indica $p < 0,05$ i ** indica $p < 0,01$.

	AR-ILD (n=37)	AR-no ILD (n=141)	p valor
CFFCHP-1			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-1	24 (64,8)	80 (56,7)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	113 (2525)	49 (292)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-1	22 (59,4)	42 (29,8)	<0,005
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	31 (497)	3 (34)	<0,005
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-1	12 (32,4)	25 (17,7)	0,05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	0 (537)	0 (33)	0,04
CFFCHP-2			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-2	25 (67,6)	78 (55,3)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	134 (2126)	43 (377)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-2	21 (56,7)	49 (34,8)	0,02
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	24 (374)	5 (51)	<0,005
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-2	13 (35,1)	28 (19,8)	0,05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	10 (359)	0 (39)	0,01
CFFCHP-3			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-3	25 (67,6)	77 (54,6)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	135 (2826)	54 (351)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-3	19 (51,3)	45 (31,9)	0,03
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	27 (308)	16 (31)	0,009
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-3	13 (35,1)	28 (19,8)	0,05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	22 (440)	0 (46)	0,007
CFFCHAP			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHAP	24 (64,9)	71 (50,4)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	67 (3123)	23 (211)	0,008
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHAP	18 (48,6)	40 (28,4)	0,02
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	18 (319)	0 (33)	0,01
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHAP	13 (35,1)	28 (19,8)	0,05
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	17 (267)	0 (24)	0,02

Taula 25: Resposta anti-AMPA observada en la comparació de la població d'AR-ILD (n=37) vs AR-no ILD (n=141). En els resultats que fan referència a la positivitat, el primer nombre fa referència al nombre absolut de pacients positiu de la població mentre que entre parèntesis s'indica el percentatge de la població al que correspon. Pel que fa als nivells medians, s'expressa en nombre absoluts el valor de la mediana i entre parèntesis es fa referència als valors corresponents al rang interquartílic de la mostra. S'observen diferències significatives per totes les especificitats fines en els isotips IgA i IgM, tant en nivells medians d'anticossos com en percentatge de positivitat. En el cas de l'isotip IgG només s'observen diferències significatives en els nivells d'anti-AMPA detectats amb el pèptid triplement modificat CFFCHAP.

Tenint en compte els resultats obtinguts, i observada la major resposta anti-AMPA en els pacients que presenten la manifestació extra-articular, ens vam plantejar la pregunta de si emprant els resultats de positivitat obtinguts en els diferents pèptids es podia millorar el diagnòstic general en termes de detecció de positivitat d'aquest subgrup que presenta un fenotip clínic especialment greu.

Per fer aquesta comparativa, es va treballar amb els resultats obtinguts del pèptid totalment citrul·linat (CFFCP-1), el pèptid doblement modificat que havia donat millors resultats (CFFCHP-1) i el pèptid triplement modificat (CFFCHAP). Els resultats obtinguts, mostrats en la Figura 44, demostren que efectivament l'ús simultani dels resultats dels tres pèptids permet millorar de forma general la detecció de casos positius en el subgrup d'AR-ILD. En el cas de l'isotip IgG, els resultats del pèptid CFFCHAP van permetre detectar un 5,4% de casos que eren negatius per els altres dos pèptids, el doblement modificat i el totalment citrul·linat. En el cas de l'IgM, tant el pèptid triplement modificat com el doblement modificat detectaven de forma exclusiva cadascun un 2,7% dels casos, de tal manera que cadascun contribueix a un augment de la sensibilitat si s'agafen els resultats de forma simultània. Destaca, sobretot, el cas que ens trobem amb l'isotip IgA, on ens trobem fins a un 8.1% dels casos que són detectats de forma exclusiva per el pèptid doblement modificat mentre que el pèptid triplement modificat aportaria un 2.7% dels casos, igual que el pèptid totalment citrul·linat.

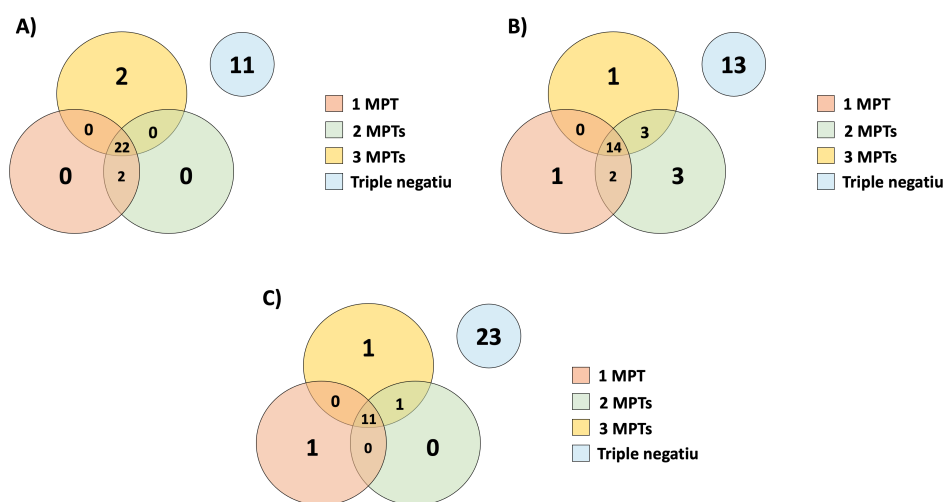


Figura 44: Anàlisi del solapament de les positivitats anti-AMPA detectada amb els diferents antígens quimèrics en els pacients d'AR-ILD. (A) Solapament observat en l'isotip IgG. (B) Solapament observat en l'isotip IgA. (C) Solapament observat en l'isotip IgM. Els pèptids analitzats són l'antigen quimèric totalment citrul·linat (1 PTM – CFFCP-1), l'antigen quimèric homocitrul·linat/citrul·linat (2 PTMs – CFFCHP-1) i l'antigen quimèric triplement modificat amb acetil lisina/homocitrul·lina/citrul·linat (3 PTMs – CFFCHAP).

Així doncs, és destacable que en els isotips IgG i IgM, la presència de dues o tres modificacions post-traduccionals dins l'estructura del pèptid permet detectar un 5,4% de sèrums que haguessin estat considerats negatius si només es tingués en compte la citrul·linació. En el cas de l'isotip IgA, aquest percentatge és encara més elevat i la introducció de les noves modificacions post-traduccionals permet detectar fins a un 20% més de casos positius.

2.6 Estudi de la resposta AMPA en pacients amb malaltia articular greu

Posteriorment, es va centrar l'atenció en una altra manifestació característica d'AR d'evolució greu com és la presència de malaltia articular greu. Per determinar quins dels 178 pacients de la població d'estudi inicial es pot considerar que tenen una malaltia més erosiva (aquells que presenten una destrucció articular visible radiològicament) es va dur a terme la determinació de la puntuació de Larsen a l'Unitat d'Artritis de l'Hospital Clínic de Barcelona. En aquest assaig es va definir una AR greu amb una marcada destrucció articular quan aquesta puntuació va superar els 18 punts mentre que quan va ser menor es va considerar erosivitat lleu. La divisió de la població d'acord a aquest punt de tall ens va portar a tenir un grup de pacients catalogats com pacients d'AR amb destrucció articular greu (n=90) i un altre grup de pacients d'AR amb destrucció articular lleu (n=88).

Amb els dos grups resultants d'aquesta classificació es va dur a terme un assaig comparatiu de la resposta AMPA dels dos grups amb les especificitats fines ja incloses en els assaigs previs (pèptids CFFCHP-1, CFFCHP-2, CFFCHP-3 i CFFCHAP). En aquesta comparativa entre els dos grups es va observar una clara associació de una major destrucció articular amb nivells més alts d'AMPAs detectats amb les quatre especificitats estudiades. Les diferències eren estadísticament significatives per tots els pèptids, especialment en els isotips IgA i IgM. També es va observar una diferència significativa pel que fa a la presència d'anti-AMPA i la presentació d'una malaltia articular greu quan es va fer l'anàlisi amb el pèptid triplement modificat CFFCHAP, fet que no es va replicar amb les altres especificitats analitzades tot i la tendència similar observada (Taula 26).

	Larsen < 18 (n=88)	Larsen ≥ 18 (n=90)	p valor
CFFCHP-1			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-1	46 (52,3)	58 (64,4)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	34 (181)	101 (764)	0,02
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-1	24 (27,3)	40 (44,4)	0,02
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	0 (26)	11 (127)	0,008
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-1	13 (14,8)	24 (26,7)	0,05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	0 (17)	0 (109)	0,04
CFFCHP-2			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-2	46 (52,3)	57 (63,3)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	28 (166)	86 (1164)	0,03
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-2	28 (30,7)	42 (46,7)	0,04
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	4 (33)	18 (143)	0,008
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-2	14 (15,9)	27 (30,0)	0,03
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	0 (25)	0 (94)	0,02
CFFCHP-3			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-3	45 (51,5)	57 (63,3)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	24 (233)	107 (807)	0,02
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-3	28 (30,7)	36 (40,0)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	16 (29)	20 (134)	0,05
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-3	14 (15,9)	27 (30,0)	0,03
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	0 (34)	0 (111)	0,01
CFFCHAP			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHAP	40 (45,4)	55 (61,1)	0,036
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	18 (109)	55 (891)	0,01
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHAP	21 (23,9)	37 (41,1)	0,01
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	0 (23)	18 (133)	<0,005
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHAP	16 (18,2)	25 (27,8)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	0 (20)	0 (45)	0,03

Taula 26: Resposta anti-AMPA observada en la comparació de la població amb destrucció articular greu (Larsen ≥ 18, n=90) vs destrucció articular lleu (Larsen < 18, n=88). En els resultats de positivitat, el primer nombre fa referència al nombre absolut de pacients positiu de la població mentre que entre parèntesis s'indica el percentatge de la població al que correspon. En l'expressió dels nivells medians, s'expressa en nombre absoluts el valor de la mediana i entre parèntesis es fa referència als valors corresponents al rang interquartílic de la mostra.

3. Preparació d'antígens amb adductes de malondialdehid-acetaldehid i determinació de la presència d'anti-MAA en pacients amb artritis reumatoide

3.1 Síntesi i caracterització del compost control: hexil-MAA

La síntesi de l'1-hexil-4-metil-1,4-dihidro-3,5-piridindicarboxaldehyd (hexil-MAA) requereix de l'ús de la sal de sodi de malondialdehid (MDA-Na) com a reactiu, que es va obtenir seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.1 del capítol de Materials i Mètodes. El rendiment d'aquesta reacció va ser del 10%. Una vegada obtinguda la MDA-Na, es va poder sintetitzar l'hexil-MAA seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.2 del capítol de Materials i Mètodes. Després de liofilitzar el compost obtingut en solució, es van obtenir 15mg d'un sòlid groc. El rendiment global d'obtenció de l'hexil-MAA (síntesi i purificació) va ser del 8,6%.

L'anàlisi per H^1 -RMN va permetre comprovar la correcta estructura de l'hexil-MAA obtingut (Figura 45). L'espectre mostra els següents desplaçaments químics: δ 9.2 (s, 2H, CHO), 6.6 (s, 2H, CdCH), 3.9 (q, J) 6.6 Hz, 1H, CH-CH₃), 3.4 (t, J) 7.0 Hz, 2H, NCH₂), 1.2- 1.8 (m, 8H, (CH₂)₄), 1.1 (d, J) 6.6 Hz, 3H, CH₃-CH), 0.9 (t, J) 6.2 Hz, 3H, CH₃-CH) i que es corresponen als descrits en la literatura¹⁶⁵.

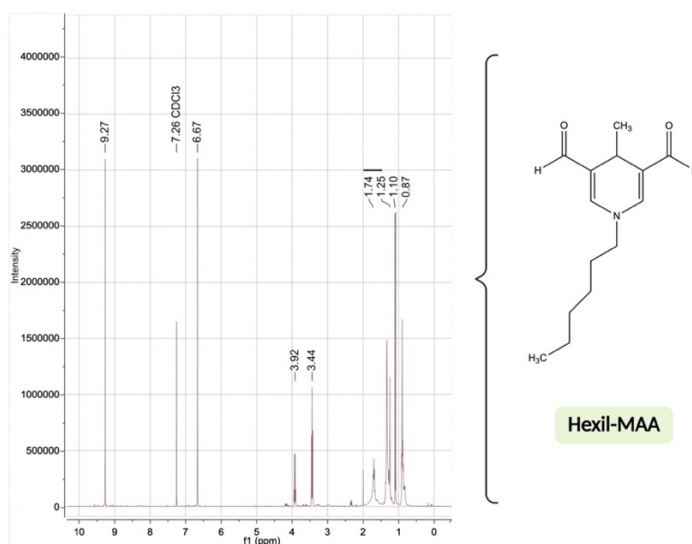


Figura 45: Espectre de H^1 -RMN del compost hexil-MAA. A l'eix de les abscisses es mostren els desplaçaments químics (δ) per cada àtom d'H o grup d'H del compost hexil-MAA. L'alçada de cadascun dels pics representa la intensitat de la senyal, que és proporcional al nombre d'àtoms d'hidrogen. Els valors obtinguts experimentalment de l'anàlisi es corresponen amb els prèviament publicats per Xu et al¹⁶⁵. El pic obtingut al desplaçament químic de 7,26 correspon al dissolvent emprat, en aquest cas cloroform deuterat (CDCl₃).

3.2 Modificació de les proteïnes i verificació de la formació d'adductes de MAA

3.2.1. Anàlisi de la fluorescència

La reacció de modificació de les proteïnes es va donar segons el procediment indicat a l'apartat 2.2.1 de Materials i Mètodes. Una vegada passades les 72h de reacció, es van separar els reactius malondialdehid i acetaldehid de la mostra mitjançant el procés de diàlisi, i es va obtenir la proteïna modificada en solució. Un cop recuperades les proteïnes del *cassette* de diàlisi, es va obtenir un volum final de 1,5mL de cadascuna de les mostres. Les solucions que contenien les mostres de proteïna-MAA presentaven una coloració groguenca, mentre que les solucions amb les mostres control eren transparents. Amb aquestes mostres en solució, es va dur a terme la verificació de la formació dels adductes de MAA tant en l'albumina sèrica humana (HSA, de l'anglès *human serum albumin*), com en el fibrinògen (Fib).

Aquest procés va consistir en l'anàlisi de l'espectre d'emissió de fluorescència de les dues proteïnes, tant en les seves versions modificades com en les que no s'havien fet reaccionar que es van emprar com a control. Per mesurar l'espectre d'emissió, es va dur a terme l'excitació a una longitud d'ona de 398nm, tal i com es descriu a la literatura¹⁶⁵. Els resultats van mostrar clarament com la mostra modificada d'ambdues proteïnes presenta un pic de fluorescència a una longitud d'ona de 460nm (Figura 46), valor que es correspon al màxim d'emissió observat en l'estudi de fluorescència d'emissió de l'hexil-MAA (Figura 47-A). En canvi, les mostres no modificades, mostren un pic molt més reduït i que se solapa amb el del tampó sense proteïna – per tant, es pot considerar que aquestes mostres no presenten fluorescència detectable a aquesta longitud d'ona.

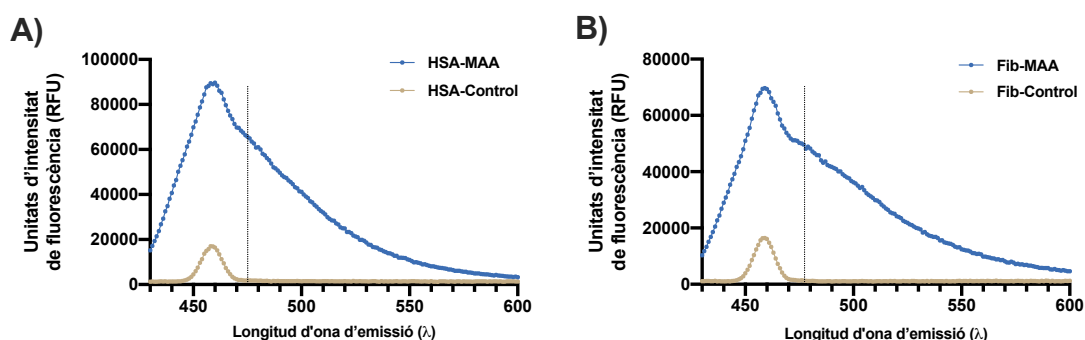


Figura 46: Espectres d'emissió de fluorescència obtinguts de l'anàlisi de les dues proteïnes analitzades.

Els resultats es mostren en unitats d'intensitat de fluorescència relativa (RFUs) a l'eix de les ordenades i longitud d'ona d'emissió a l'eix de les abscisses. (A) Forma modificada amb adductes de MAA, en blau i la no modificada, en marró, de l'albumina humana sèrica. (B) Espectre corresponent a la forma modificada amb adductes de MAA, en blau i la no modificada, en marró, del fibrinogen.

La comparació de la observació de fluorescència de les proteïnes modificades i les proteïnes control, juntament amb l'anàlisi de la corba de dilucions de l'hexil-MAA (Figura 47-B) va permetre el càlcul del ratio de fluorescència (proteïna modificada/control) tant de l'albumina sèrica humana com del fibrinogen. En el cas de l'HSA-MAA, el ratio F/M va ser de $1,92 \pm 0,11$ i en el cas del Fib-MAA aquest ratio va donar com a resultat $10,43 \pm 0,48$. En ambdós casos els resultats obtinguts van superar l'1, que es considera el valor mínim per confirmar que l'adducció de MAA s'ha donat de forma correcta. Per tant, les proteïnes estaven suficientment modificades i es van emprar en les posteriors anàlisis.

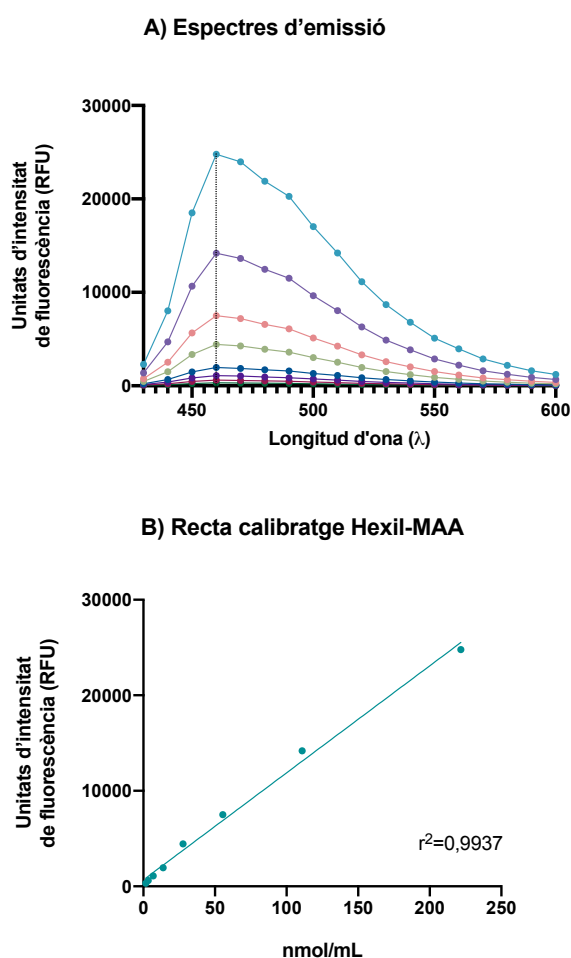


Figura 47: Recta de calibratge d'hexil-MAA. (A) Espectres d'emissió de fluorescència obtinguts de les diferents concentracions que s'inclouen com a punts de la recta de calibratge de l'hexil-MAA. Es marca amb una línia discontinua de punts la longitud d'ona de 460nm on s'observa el màxim d'emissió en tots els casos. (B) Recta de calibratge obtinguda amb els valors d'intensitat corresponents a la longitud màxima d'emissió de 460nm de cadascuna de les concentracions analitzades.

3.2.2. Quantificació de les proteïnes

La quantificació de la proteïna present en les mostres de HSA-MAA i Fib-MAA, es va dur a terme mitjançant el mètode de Bradford, emprant una corba de calibració de l'albumina sèrica bovina (Figura 48-A). Per totes les mostres la concentració de la proteïna era propera a 1mg/mL (Figura 48-B).

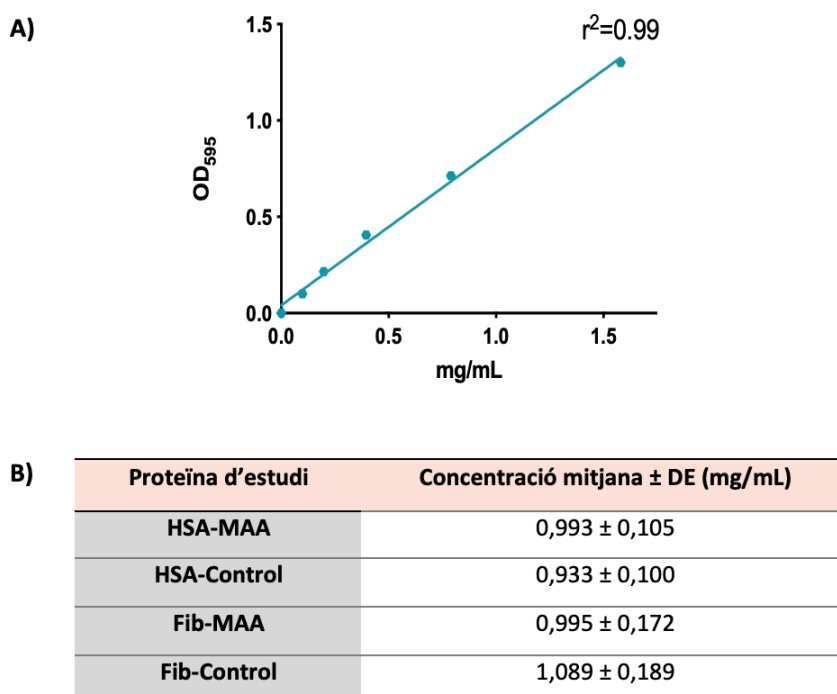


Figura 48: Quantificació de la concentració proteica de les solucions obtingudes després de la reacció de formació d'adductes de MAA. (A) Representació gràfica de la corba de calibració d'albumina sèrica bovina emprada per la quantificació de la concentració proteica mitjançant el mètode de Bradford. (B) Resultats de la concentració de cada proteïna representada com la mitjana \pm desviació estàndard.

3.3 Modificació del pèptid CFFCP-R i verificació de la correcta formació d'adductes de MAA en la seva estructura per obtenir el pèptid CFFCMaP

A diferència de la citrul·lina, homocitrul·lina o acetil lisina, no està disponible comercialment una lisina modificada amb l'adducte MAA per la seva incorporació durant el procés de síntesi en fase sòlida. Per l'obtenció del pèptid modificat amb l'adducte de MAA (CFFCMaP) es va treballar primer en la síntesi d'una estructura primària sobre la qual es va induir de forma posterior la formació d'aquest adducte sobre els residus de lisina (Figura 49).

Així doncs, en primer lloc es va treballar en la síntesi de l'estructura de referència del pèptid quimèric cíclic de fibrina i filagrina que representa la base de múltiples pèptids emprats durant el desenvolupament d'aquesta tesi. Aquesta estructura en la seva forma nativa presenta dues lisines, a les posicions 620 i 625 del domini d' α -fibrina (617-631), sobre les quals es va dur a terme la formació dels adductes de MAA mitjançant el tractament del pèptid amb malondialdehid:acetaldehid (2:1) tal i com es descriu en l'apartat 2.2.1 de Materials i Mètodes.

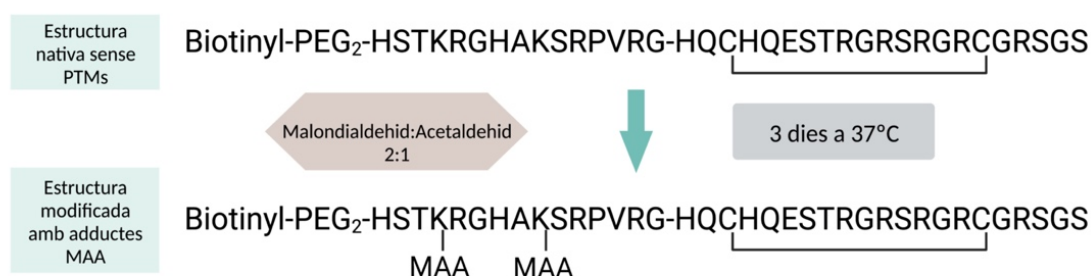


Figura 49: Esquema de la formació d'adductes de MAA sobre el pèptid CFFCP-R per obtenir el pèptid CFFCMaP. En primer lloc es mostra l'estructura del pèptid quimèric de fibrina i filagrina amb la seva estructura nativa i en segon lloc es mostren els punts, les lisines, on es formen els adductes de MAA.

El pèptid inicial emprat estava ja ciclats i purificat. Després de la reacció amb malondialdehid i acetaldehid, es va observar a ull nu una coloració groga indicativa de la formació dels adductes. La seva correcta formació es va verificar mitjançant l'anàlisi per espectrometria de masses, que va confirmar que els adductes s'havien format de forma satisfactòria en les dues lisines presents. Un cop finalitzada la reacció, el pèptid CFFCMaP obtingut va tornar a ser purificat, amb un rendiment del 13,4%. Tal i com s'ha fet amb tots els pèptids inclosos en els múltiples assaigs que formen part d'aquesta tesi, també es va determinar el grau de puresa de la mostra obtinguda, que superava el 95% (Figura 50).

3.4 Determinació dels anticossos anti-MAA en pacients en la població d'AR i una població control

La determinació dels anticossos anti-MAA, amb els diferents antígens proteics (HSA-MAA, Fib-MAA i CFFCMaP), es va dur a terme en la població d'AR establerta de 178 pacients descrita a l'apartat 4.2 de Materials i Mètodes. Com a grup control, també es van fer servir 120 mostres provinents de banc de sang (població general). En tots els casos es va determinar la sensibilitat i especificitat dels diferents tests i es va establir el punt de tall corresponent al percentil 95 dels valors obtinguts amb les mostres del grup control, tal i com ha estat descrit prèviament¹⁶⁸.

Es va realitzar la comparació entre la sensibilitat obtinguda en la nostra cohort d'estudi emprant l'antigen HSA-MAA amb dues altres cohorts, en les que també es feia la detecció anti-MAA amb el mateix antigen. Aquestes altres dues cohorts amb les quals hem comparat algunes de les dades provenen de dos dels estudis de referència realitzats per un grup de recerca de la Universitat de Nebraska, el grup pioner en la descripció de la relació entre els anticossos anti-MAA i l'AR. Més concretament, la primera de les poblacions de referència rep el nom de VARA (de l'anglès *Veterans Affairs Rheumatoid Arthritis*) i consta de 1720 mostres de pacients d'AR, predominantment homes, que és analitzada en una publicació de Thiele et al¹⁶¹ de l'any 2015. La segona de les poblacions forma part d'un estudi posterior on es compara la presència d'anti-MAA en una cohort independent d'AR anomenada VAMC (ja que van ser recollides als *Veterans Affairs Medicals Centers*) i que està conformada per 284 pacients d'AR, també predominantment homes. Els resultats d'aquesta cohort es van reportar en una publicació de Mikuls et al¹⁶⁸ de l'any 2018.

En aquestes publicacions, a part d'establir la presència d'anticossos anti-MAA en pacients d'AR, també s'analitza la relació d'aquests anticossos amb la presència d'ACPA. És per aquesta raó, que per poder comparar els nostres resultats amb els obtinguts amb aquestes altres cohorts, s'ha subdividit la nostra població d'AR (n=178) en el subgrup CCP (+) (n=127) i CCP (-) (n=51) en funció de la resposta ACPA analitzada amb el test CCP3.

Finalment, en una publicació posterior¹⁶⁷, s'analitza la relació dels anticossos anti-MAA amb la presència de la manifestació extra-articular de la malaltia pulmonar intersticial. En aquest nou anàlisi que inclou 1820 pacients, troben una relació significativa entre els nivells mitjans d'anti-MAA-HSA dels isotips IgA i IgM i la presència d'AR-ILD en comparació amb els pacients que només presenten AR sense afectació pulmonar. No s'observa aquesta diferència en l'isotip IgG.

Tal i com s'ha vist en apartats previs, la nostra cohort d'AR es pot subdividir també d'acord a aquests paràmetres en AR-ILD (n=37) i AR no-ILD (n=141). Es farà també una breu comparativa dels resultats obtinguts en la nostra població d'anàlisi i els resultats exposats en aquest nou estudi per determinar si aquest fenomen es reproduïx també en la nostra cohort. A continuació s'exposen els resultats que s'han obtingut mitjançant la determinació d'anti-MAA emprant diferents antígens i les respectives comparatives amb les referències estudiades.

3.4.1 Albúmina sèrica humana – MAA

En primer lloc es va dur a terme la determinació dels anti-MAA amb el mateix antigen descrit en els articles de referència, l'albúmina sèrica humana modificada amb MAA. El protocol per realitzar l'assaig també va seguir els passos prèviament establerts¹⁶¹. La determinació de la presència d'anti-MAA es va dur a terme per 3 isotips – IgG, IgA i IgM.

Els punts de tall de positivitat, corresponents al valor del percentil 95 dels resultats obtinguts en les mostres del grup control analitzades, van ser de $\geq 1,18$ ng/mL per l'isotip IgA, $\geq 3,22$ ng/mL per l'isotip IgG i $\geq 1,49$ ng/mL per l'isotip IgM. Amb aquests punts de tall, la sensibilitat de l'assaig amb albúmina humana sèrica – MAA com antigen va ser de 12,9% en l'isotip IgA, 7,3% en l'isotip IgG i no es va observar cap mostra en l'isotip IgM que superés el llindar de positivitat. No es van trobar diferències estadísticament significatives en els nivells observats pels dos grups d'assaig (AR vs control) pels isotips IgA i IgG. Sí que se'n van observar per l'isotip IgM, però del signe contrari a l'esperat – es van observar nivells més alts en la població control (Figura 51). Els nivells mitjans observats en l'isotip IgG (1,61ng/mL) van ser més elevats que en els altres dos isotips (0,46ng/mL en l'IgA i 0,27ng/mL en IgM).

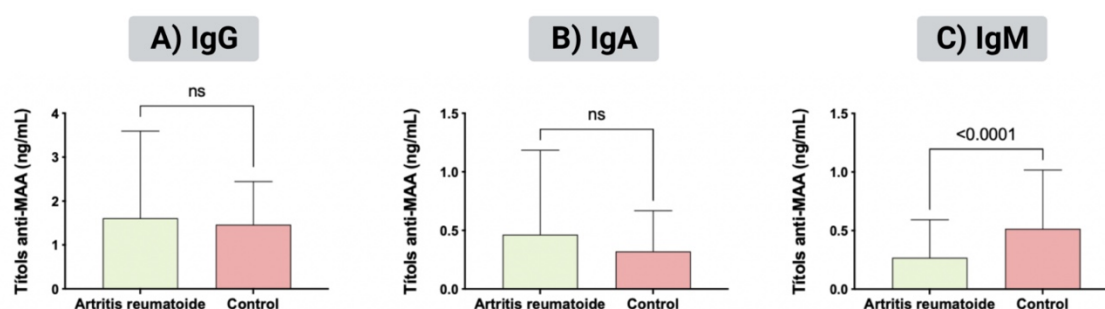


Figura 51: Comparació dels nivells d'anti-HSA-MAA obtinguts en la població d'AR de l'Hospital Clínic (n=178) i en el grup control (n=120). En cada comparació es mostra el resultat de l'anàlisi estadística. Es considera significatiu quan el p-valor és inferior a 0,05. En el cas de no ser significatiu en el gràfic s'indica amb les inicials ns.

3.4.1.1 Comparació dels valors de sensibilitat general obtinguts amb els dels estudis de referència

Els valors de sensibilitat obtinguts estan molt allunyats dels que s'obtenen en el primer estudi de referència (VARA), on es parla de valors mínims de positivitat del 38% en l'isotip IgM, del 73% en IgA i de fins al 92% en l'isotip IgG. També ho estan del segon estudi (VAMC), on els valors exposats són del 18% en l'isotip IgM, del 52% en l'isotip IgA i del 80% en l'isotip IgG. En fer l'anàlisi de comparació de les sensibilitats obtingudes, veiem que existeixen diferències significatives entre els nostres resultats i els dels dos estudis de referència ($p < 0,0001$) per tots els isotips. A més, també observem diferències significatives entre els dos estudis de referència (VARA vs VAMC, $p < 0,0001$) en tots els isotips (Taula 27).

Resultats obtinguts	H. Clínic (n=178)	VARA (n=1720)	VAMC (n=284)	Clínic vs VARA	Clínic vs VAMC	VARA vs VAMC
Anti-CCP (+) (%)	127 (71)	1340 (77,9)	241 (85)	0,047	0,0004	0,0078
Anti-MAA-IgG (+) (%)	13 (7,3)	1581 (92)	227 (80)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Anti-MAA-IgA (+) (%)	23 (12,9)	1258 (73)	148 (52)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Anti-MAA-IgM (+) (%)	0 (0)	660 (38)	51 (18)	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Taula 27: Comparació dels resultats obtinguts en la població d'estudi de l'Hospital Clínic (n=178) vs VARA (n=1720), i VAMC (n=284). Es mostren en valors absoluts la "n" de pacients que compleixen la positivitat dels resultats estudiats i entre parèntesis el % de població que representen. Els càlculs dels nombres de pacients de les poblacions VARA i VAMC s'han obtingut a través de les dades de percentatge mencionades en les seves respectives publicacions^{161,168}. Les dades de freqüència anti-CCP de la població VAMC s'ha obtingut d'un estudi previ realitzat per Mikuls et al³⁵⁵ en aquesta mateixa cohort. Les últimes tres columnes mostren el p-valor de la comparació de proporcions mitjançant el test χ^2 dels resultats obtinguts en els diferents centres.

3.4.1.2 Comparació de la positivitat i els nivells d'anticossos en els grups CCP (+) i CCP (-) obtinguts de la nostra població i comparació amb estudis de referència

En l'anàlisi de la positivitat anti-MAA en els subgrups CCP (+) i CCP (-) en la primera població d'estudi s'observen diferències significatives en l'isotip IgG (93% vs 88%, $p=0,014$), l'isotip IgA (76% vs 63%, $p < 0,001$) i l'isotip IgM (41% vs 29%, $p < 0,001$).

En el segon treball, aquesta associació entre la presència d'ACPA i la positivitat per anti-MAA només es confirma en l'isotip IgG (83% vs 66%, $p=0,01$) mentre que no s'observen diferències en els isotips IgA (52% vs 52%) i IgM (18% vs 17%).

En la nostra cohort no s'observen tampoc diferències entre el grup CCP (+) i CCP (-) en la positivitat anti-MAA per l'isotip IgG (7,1% vs 7,8%), l'isotip IgA (13,4% vs 11,8%) o l'isotip IgM on no es detecta cap cas positiu ni en un grup ni en l'altre. Els resultats es poden observar a la Taula 28.

Antigen		Hospital Clínic (n=178)			VARA (n=1720)			VAMC (n=284)		
		CCP (+) (n=127)	CCP (-) (n=51)	p- valor	CCP (+) (n=1340)	CCP (-) (n=380)	p- valor	CCP (+) (n=241)	CCP (-) (n=43)	p- valor
IgG	Anti-HSA-MAA	7	8	0,861	93	88	0,014	83	66	0,007
IgA	Anti-HSA-MAA	13	12	0,771	76	63	<0,001	52	52	0,932
IgM	Anti-HSA-MAA	0	0	1	41	29	<0,001	18	17	0,756

Taula 28: Comparació de la positivitat anti-MAA testada amb diferents antigens entre el grup CCP (+) i CCP (-) de tres estudis diferents. La primera columna fa referència als resultats obtinguts en els nostres assaigs realitzats amb la cohort provinent de mostres de l'Hospital Clínic. La segona columna fa referència als valors obtinguts per Thiele et al¹⁶¹. La tercera columna fa referència als resultats obtinguts en la cohort de l'estudi de Mikuls et al¹⁶⁸. Les dades de positivitat de CCP d'aquest tercer grup han estat extretes d'un estudi previ realitzat amb la mateixa cohort de pacients³⁵⁵.

Per altra banda, l'estudi original de Thiele et al¹⁶¹ comunica la presència de diferències significatives pel que fa als nivells d'anti-MAA en la població d'AR respecte la control però també aprofundeix dins l'anàlisi en la població d'AR i confirma que existeixen diferències significatives entre els grups CCP (+) i CCP (-). En aquest estudi, el grup CCP (+) presenta nivells més alts d'anti-MAA pels tres isotips analitzats que el grup de pacients seronegatius, i ho fa de forma significativa ($p < 0,001$). En l'estudi posterior¹⁶⁸, aquests resultats només han estat reproduïts en l'isotip IgG ($p = 0,01$) però no en l'isotip IgA ni IgM. Aquests resultats tampoc han estat replicats en la nostra cohort, on la comparació d'aquests dos subgrups testats amb HSA-MAA no mostra cap diferència significativa en cap dels tres isotips (Figura 52). L'única diferència observada és en l'isotip IgM on els BS presenten valors superiors als altres dos grups d'assaig.

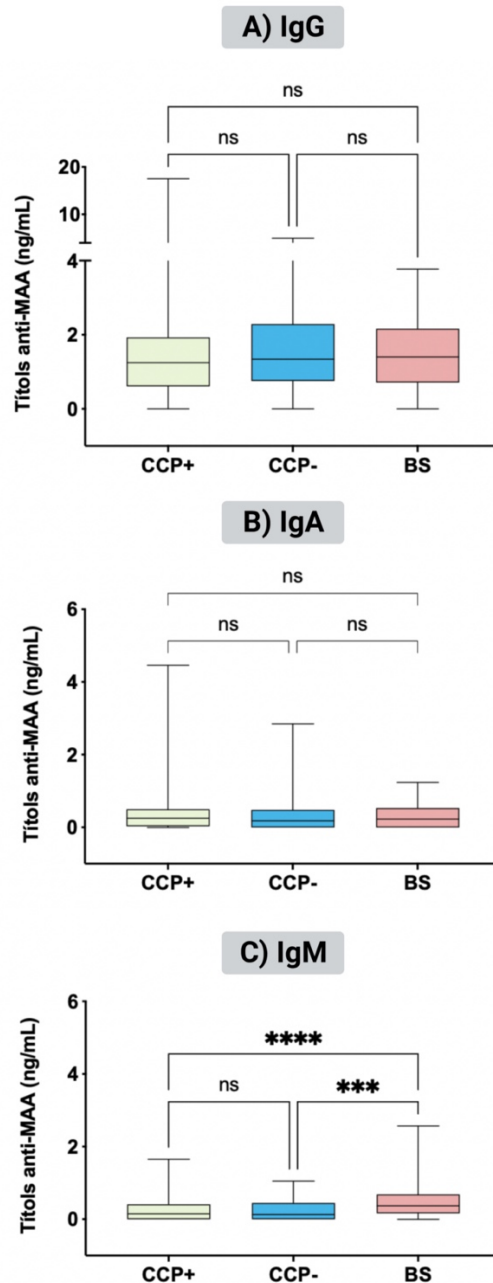


Figura 52: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antígen l'albumina sèrica humana modificada per presentar adductes MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en CCP+ i CCP- i en el grup control. (A) Resultats obtinguts per l'isotip IgA, (B) Resultats obtinguts per l'isotip IgM (C) Resultats obtinguts per l'isotip IgG. El valor de la mediana de cada categoria es mostra amb la ratlla horitzontal al mig de cada box plot. En totes les comparacions s'indica el resultat de la comparació estadística. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05. *** indica $p < 0,001$ i **** indica $p < 0,0001$. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

Així doncs, els resultats obtinguts mostren com en termes generals s'observa clarament que no existeix una diferència com l'esperada entre els nivells d'anticossos anti-MAA en el grup de pacients d'AR i el grup control de la nostra cohort. Tampoc s'observa una diferència entre els pacients CCP+ i els CCP-.

3.4.1.3 Comparació de la positivitat i els nivells d'anticossos en els grups ILD i no-ILD obtinguts de la nostra població i comparació amb els estudis de referència

L'anàlisi dels resultats obtinguts en la nostra cohort en funció de la presència o absència de malaltia pulmonar intersticial en els pacients d'AR no permet trobar cap relació estadísticament significativa que confirmi una associació amb la presència de resposta anti-MAA. Les comparacions de proporcions dels diferents isotips mostren que les positivitats són comparables entre els dos grups i pels tres isotips d'anàlisi, IgA ($p=0,66$), IgG ($p=0,39$) i IgM ($p=1,0$).

Per altra banda, l'estudi de l'associació dels nivells d'anti-MAA en els diferents subgrups de la població d'AR (AR-ILD o AR-no ILD) i el grup control tampoc ha mostrat que existeixi una relació que mostri la presència de nivells més alts en el grup que presenta la manifestació extra-articular en cap dels isotips. Per cap dels isotips es mostren diferències significatives pels subgrups AR-ILD vs AR-no ILD. Només observen diferències significatives, tal i com ja s'ha vist en els estudis comparatius previs, entre els dos subgrups de població d'AR i el grup control en l'isotip IgM i la relació mostrada és la contrària a l'esperada, en la qual s'observa un major nivell d'anticossos d'aquesta família en el grup control que en qualsevol dels dos subgrups d'AR (Figura 53).

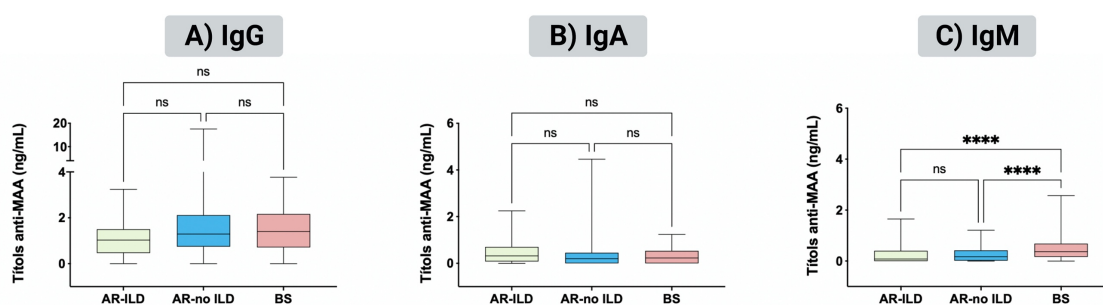


Figura 53: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antígen l'HSA-MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control. (A) Resultats obtinguts per l'isotip IgA (B) Resultats obtinguts per l'isotip IgM (C) Resultats obtinguts per l'isotip IgG. El valor de la mediana de cada categoria es mostra com la ratlla horitzontal de cada box plot. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05. **** indica un p-valor < 0,0001. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

3.4.2 Fibrinògen humà

Degut a que l'albumina sèrica humana no és una de les proteïnes que s'ha descrit com a antigen preferent pels diferents anticossos que semblen tenir importància en l'AR, vam decidir reproduir els mateixos experiments però modificant una altra proteïna que en aquest cas sí que és rellevant en l'AR, el fibrinogen. Es va dur a terme l'anàlisi de la resposta en l'isotip IgG abans d'ampliar l'anàlisi a la resta d'isotips. Es va escollir l'isotip IgG per ser el més prevalent en tots els nostres estudis previs i pels nivells més alts observats en l'estudi amb HSA-MAA.

Els resultats amb aquest nou antigen, tot i que van ser millors en termes de sensibilitat, tampoc van ser massa prometedors. En aquest cas, amb un punt de tall de $\geq 1,11$ ng/mL, corresponent al percentil 95 dels resultats del grup control, es va obtenir una sensibilitat del 18%. Amb aquest antigen sí que es van detectar diferències significatives pel que fa als nivells d'anti-MAA detectats en la població d'AR i la població control.

En fer l'anàlisi subdividint la població d'AR en funció de la presència d'ACPA, no es van observar diferències significatives entre els dos grups, tot i que es va observar una tendència a la presència de nivells més alts en el CCP (+). En canvi, sí que es van observar diferències pel que fa als nivells d'anti-MAA pel que fa a la subpoblació CCP (+) i el grup control. Aquest fet, però, no es va replicar en la comparativa CCP (-) vs BS. Per tant, amb aquest antigen sí que es va poder confirmar la tendència d'una major prevalença d'anticossos anti-MAA en la subpoblació de pacients CCP (+) (Figura 54). Aquests resultats no es van poder comparar amb els estudis previs^{161,168} degut a que els antigens emprats són diferents.

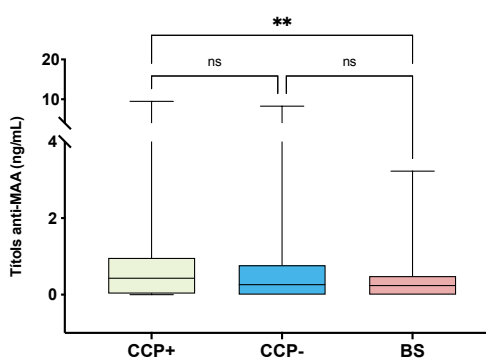


Figura 54: Títols d'anticossos anti-MAA-IgG detectats emprant com antigen el Fib-MAA en un grup de pacients d'AR (dividits en CCP+ i CCP-) i en el grup control. El valor de la mediana de cada categoria es mostra com la ratlla horitzontal de cada box plot. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05. ** indica que el p-valor < 0,01. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

En la comparació dels nivells observats entre els subgrups de pacients d'AR-ILD i AR-no ILD tampoc s'ha pogut detectar una associació entre la presència de la manifestació extra-articular i un augment de la resposta anti-MAA. De fet, en l'anàlisi de comparació de proporcions es mostra com en la població d'AR-no ILD hi ha un percentatge més alt de positivitat que en la població d'AR-ILD. En relació a l'estudi dels nivells de MAA dels dos grups, no s'observen diferències significatives entre cap dels grups (AR-ILD vs AR-no ILD, AR-ILD vs BS o AR-no ILD vs BS) (Figura 55). No s'identifica una major resposta anti-MAA en el grup AR-ILD, ni en termes de positivitat ni en presència de majors nivells d'anticossos.

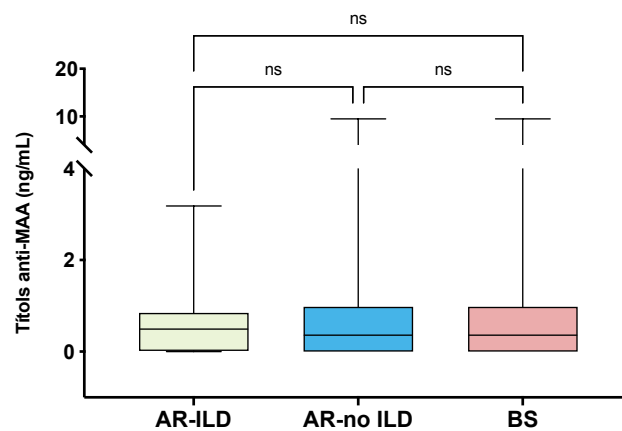


Figura 55: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen el Fib-MAA en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control. Els resultats es correspon a l'isotip IgG. El valor de la mediana de cada categoria es mostra com la ratlla horitzontal a cada boxplot. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

3.4.3 CFFCMaP

Finalment, en un nou intent de treballar amb antígens rellevants en l'AR, es va treballar amb una estructura peptídica que presentava adductes de MAA i que es va poder caracteritzar completament abans d'utilitzar-lo com antígen. En aquest cas, com s'havia fet amb el fibrinogen, també es va treballar únicament amb l'isotip IgG. Els resultats de sensibilitat van ser similars als obtinguts amb el Fib-MAA, ja que amb un punt de tall de $\geq 15,05$ ng/mL, corresponent al percentil 95 dels valors obtinguts en les mostres control, es va calcular una sensibilitat del 19,1%. L'anàlisi comparativa entre la població d'AR i la població control va mostrar que hi havia diferències significatives en el nivells d'anti-MAA dels dos grups ($p < 0,0001$).

L'anàlisi per subgrups de la població d'AR va mostrar que no existien diferències significatives entre els dos grups tot i observar-se nivells més alts en els CCP (+). En comparació amb el grup control, tant el grup CCP (-) com especialment el CCP (+) mostraven nivells més elevats d'anti-MAA (Figura 56).

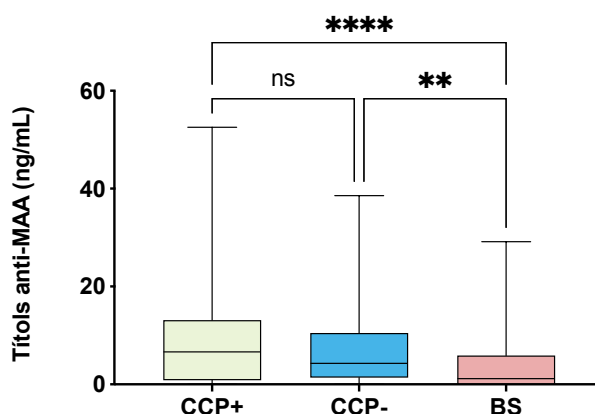


Figura 56: Títols d'anticossos anti-MAA-IgG detectats emprant com antígen el pèptid CFFCMaP en un grup de pacients d'AR (dividits en CCP+ i CCP-) i en el grup control. El valor de la mediana de cada categoria es mostra com la ratlla horitzontal a cada box plot. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05; ** indica $p < 0,01$ i **** indica $p < 0,0001$. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

Pel que fa a l'anàlisi de la relació de la resposta anti-MAA i la presència d'ILD, tampoc en aquest cas s'ha detectat cap diferència. Pel que fa a la positivitat no s'han detectat diferències significatives ($p = 0,15$), i la tendència observada indica que la positivitat està més elevada en el subgrup d'AR-no ILD respecte la població AR-ILD (21 % vs 11 %).

L'anàlisi comparativa dels nivells observats en la població AR-ILD vs AR-no ILD mostra que els nivells estan lleugerament elevats en la població d'AR-no ILD però sense arribar a mostrar diferències significativament estadístiques. Només es van observar diferències entre els nivells observats en les dues subpoblacions d'AR (ILD o no-ILD) en comparació al grup control de mostres del banc de sang. Aquestes són més importants inferior en el cas de la comparació AR-no ILD vs BS ($p < 0,0001$), que en la comparació AR-ILD vs BS ($p = 0,023$) (Figura 57).

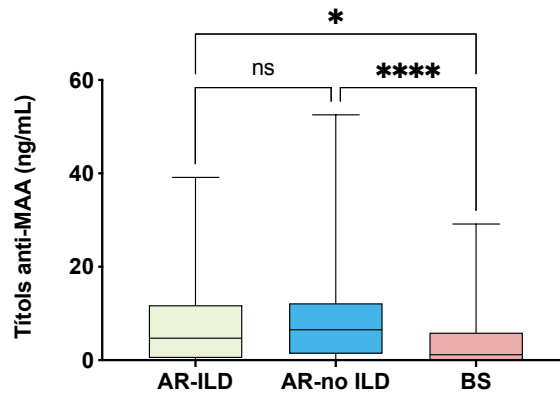


Figura 57: Títols d'anticossos anti-MAA detectats emprant com antigen el pèptid CFFCMap en un grup de pacients d'AR, dividits en funció de la presència o absència d'ILD i en el grup control. Els resultats es corresponen a l'isotip IgG. El valor de la mediana de cada categoria es mostra com la ratlla horitzontal de cada box plot. Es considera significatiu si el p-valor és inferior a 0,05. * indica $p < 0,05$ i **** indica $p < 0,0001$. En cas de resultat no significatiu, s'indica amb les inicials ns.

4. Comparació del perfil d'autoanticossos dels pacients de reumatisme palindròmic i artritis reumatoide amb antígens modificats post-traduccionals

4.1 Obtenció dels antígens emprats en la detecció de la resposta AMPA

Per analitzar els perfils d'anticossos entre dues poblacions amb malalties reumàtiques, en aquest cas l'artritis reumatoide i el reumatisme palindròmic, es va treballar amb diferents antígens. Alguns d'aquests han estat ja prèviament introduïts i se n'ha descrit la síntesi, purificació i caracterització en l'apartat de Resultats (Apartat 2, subapartats 2.2.1 i 2.4), com és el cas dels pèptids quimèrics de fibrina/filagrina amb diferents combinacions de modificacions post-traduccionals (CFFCHP-1, CFFCHP-2, CFFCHP-3 i CFFCHAP).

Els assaigs en aquestes dues poblacions s'han dut a terme també amb altres antígens de naturalesa proteica com són el fibrinogen i el FCS, que està compost per una barreja de proteïnes, en la seva forma carbamílada, per detectar la resposta anti-CarP. També s'ha treballat amb un pèptid quimèric de fibrina/filagrina que en la seva estructura només presenta una modificació post-traduccionals, la homocitrul·lina, en substitució de les 3 lisines presents de forma nativa. Més concretament, hem treballat amb el pèptid [hCit^{620,625}α-fibrina (617-631) – S³⁰⁶, S³¹⁹ ciclo [Cys^{306,319}, hCit³¹²] filagrina (304-324) que ha rebut el nom abreuiat de CFFHP (Figura 58).



Figura 58: Estructura primària del pèptid CFFHP.

4.1.1 Proteïnes carbamíladades

Les proteïnes adquirides comercialment es van carbamílar seguint els procediments prèviament descrits a Materials i Mètodes (Apartat 2.1.1). La confirmació de la correcta carbamílació dels dos antígens proteics, FCS i fibrinogen, es va obtenir mitjançant un estudi de l'anàlisi d'aminoàcids. Es van analitzar tant la forma control com la forma modificada. La introducció d'un patró d'aminoàcids va permetre la identificació correcta dels diferents aminoàcids presents a les dues mostres. En els dos antígens proteics es va observar com en la mostra homocitrul·linada es va mostrar un canvi en l'abundància relativa de la lisina i la homocitrul·lina. En les mostres control no es va observar la presència del pic corresponent a la homocitrul·lina. Els resultats de l'anàlisi

del FCS, en els quals es va mostrar un descens de l'abundància relativa de la lisina del 10% en la mostra control fins al 4% en la mostra carbamilada i l'aparició de l'homocitrul·lina fins representar un 6% dels aminoàcids presents, es mostren a continuació (Figura 59).

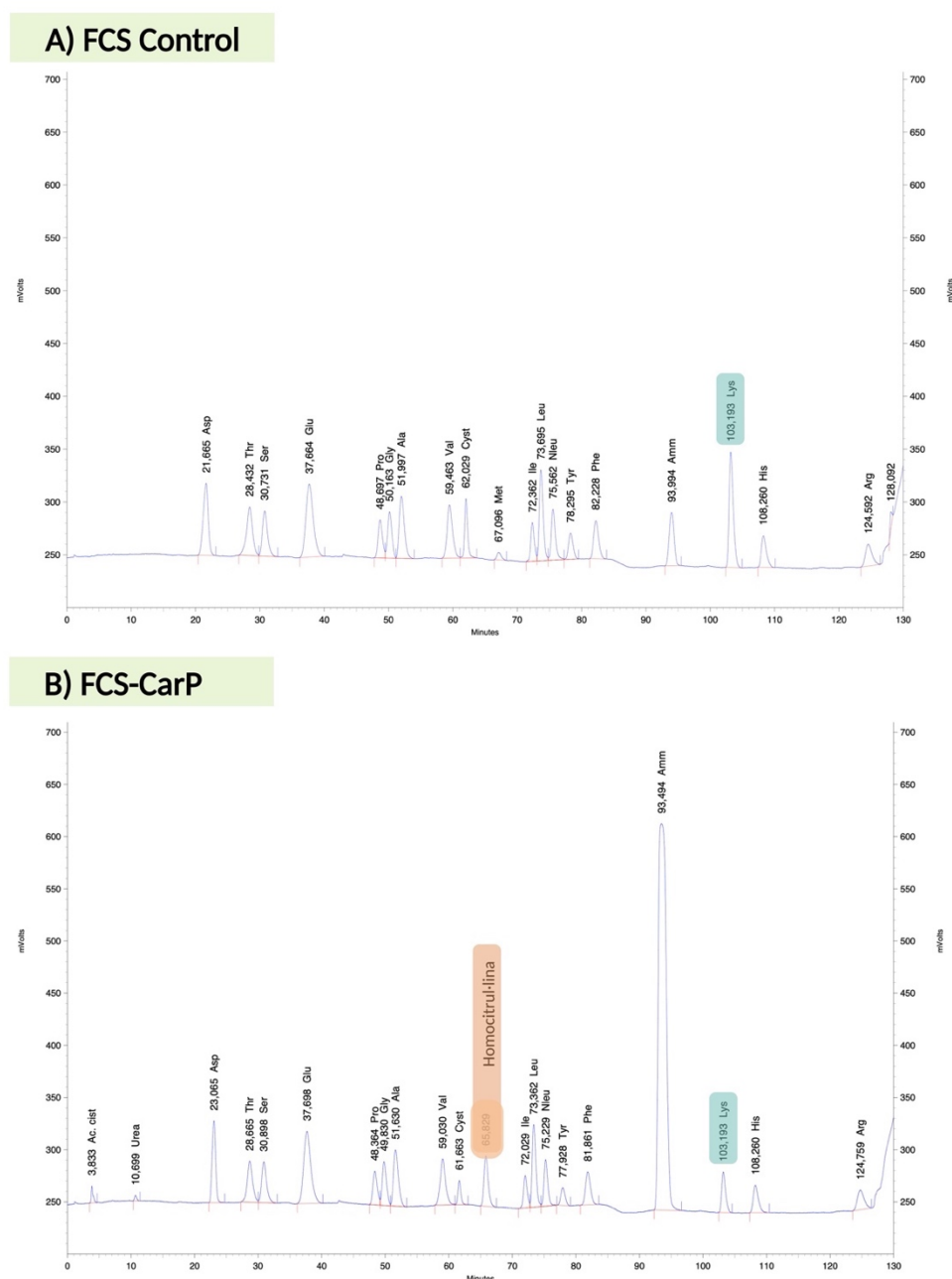


Figura 59: Cromatograma obtingut de l'anàlisi d'aminoàcids d'una mostra de proteïna (FCS) control i la seva versió carbamilada (FCS-CarP). Es mostren els pics dels diferents aminoàcids presents en la mostra carbamilada i la mostra control. (A) Cromatograma corresponent a la mostra de FCS-Control. (B) Cromatograma corresponent a la mostra de FCS-CarP. Es veu una clara davallada de l'abundància de la lisina en el FCS-CarP (B) en relació al present en el FCS control (A) (indicada en blau). També s'observa clarament l'aparició del nou pic corresponent a la homocitrul·lina (indicat en taronja) de forma exclusiva en la forma carbamilada del FCS (B).

4.1.2 Pèptid CFFHP

El pèptid es va sintetitzar en fase sòlida seguint els protocols ja descrits al capítol de Materials i Mètodes (Apartat 1.1). Posteriorment se'n va dur a terme l'escissió de la resina, la ciclació i finalment la purificació. El rendiment d'escissió va ser del 39,8% i el de ciclació i purificació de 38,4%. El rendiment global de la síntesi va ser de 15,3%. Un cop obtinguda la molècula final es va dur a terme la seva caracterització mitjançant la determinació de la puresa amb l'anàlisi a escala analítica per HPLC. L'anàlisi d'espectrometria de masses en va permetre confirmar la identitat. Els resultats es mostren a la Figura 60.

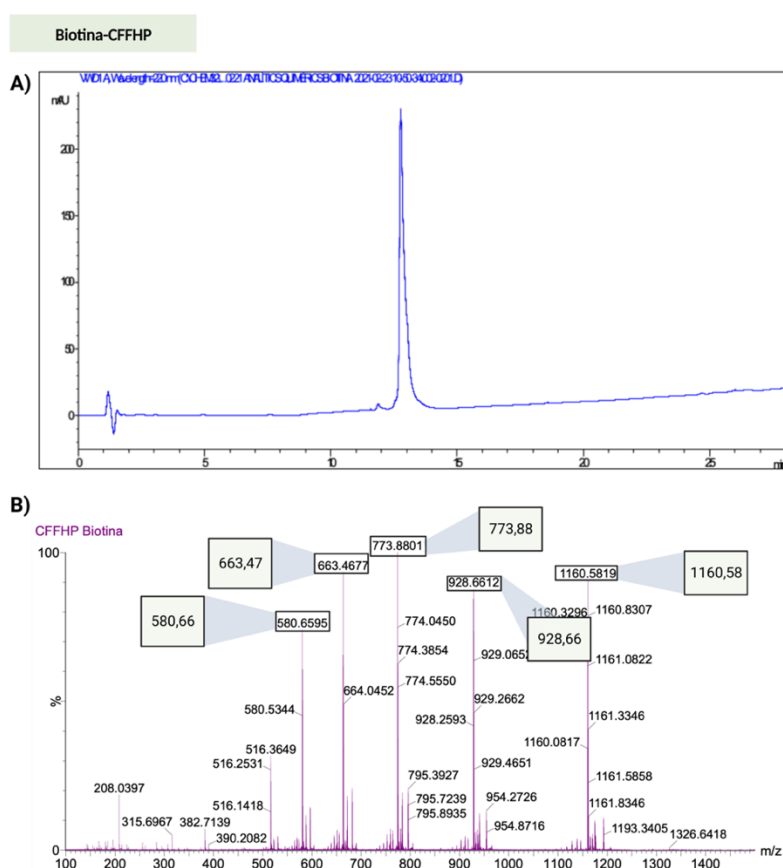


Figura 60: Caracterització per HPLC i espectrometria de masses del pèptid CFFHP. (A) Caracterització de l'elució del pèptid CFFHP per HPLC a escala analítica. Espectre obtingut amb el gradient lineal 5-95% de solvent B (ACN + 0,05% TFA) en solvent A (H₂O + 0,05% de TFA) durant 20 minuts a un flux d'1mL/min, després d'un isocràtic de 5 minuts al 5 de solvent B. (B) Espectre de masses registrat en mode d'ió positiu en un rang de m/z de 100-1500. En els requadres, es mostra una ampliació dels valors experimentals obtinguts, per major claredat. La relació de m/z calculades teòricament són les següents: [M+4H]⁺⁴=1160,78; [M+5H]⁺⁵=928,83; [M+6H]⁺⁶=774,19; [M+7H]⁺⁷=663,73; [M+8H]⁺⁸=580,89. Les masses experimentals coincideixen amb les esperades i les relacions m/z obtingudes són les següents: [M+4H]⁺⁴=1160,58; [M+5H]⁺⁵=928,66; [M+6H]⁺⁶=773,88; [M+7H]⁺⁷=663,47; [M+8H]⁺⁸=580,66.

4.2 Determinació dels punts de tall per determinar la positivitat AMPA respecte diferents antígens

La determinació dels punts de tall dels diferents antígens s'ha efectuat mitjançant l'anàlisi dels resultats obtinguts en les respostes d'autoanticossos de les mostres de la cohort de 178 pacients d'AR, que han estat comparades amb el resultat de les determinacions en 120 mostres de banc de sang. Alguns dels punts de tall descrits a continuació han estat indicats en l'apartat de resultats (Apartat 2 – Pèptids quimèrics cíclics amb múltiples modificacions post-traduccionals com antígens per la detecció d'AMPAs en pacients d'AR greu).

L'anàlisi experimental d'ELISA s'ha dut a terme segons els protocols descrits en l'apartat de Materials i Mètodes, en funció del tipus d'antigen emprat. En tots els casos s'ha incorporat a les plaques d'assaig una recta de calibrat que ha permès la interpolació dels resultats obtinguts en densitats òptiques a unitats arbitràries, el tipus d'unitat de resposta utilitzat en totes les anàlisis posteriors, inclòs el càlcul del punt de tall de positivitat. Aquest s'ha establert mitjançant la comparació de la resposta dels dos grups en una corba ROC (Figures 61 i 62). El valor s'ha obtingut fixant una especificitat del 95%. A continuació es mostren els valors de punt de tall emprats en els diferents antígens/isotips amb els que s'han analitzat les respostes en les poblacions d'assaig d'aquest estudi (Taula 29).

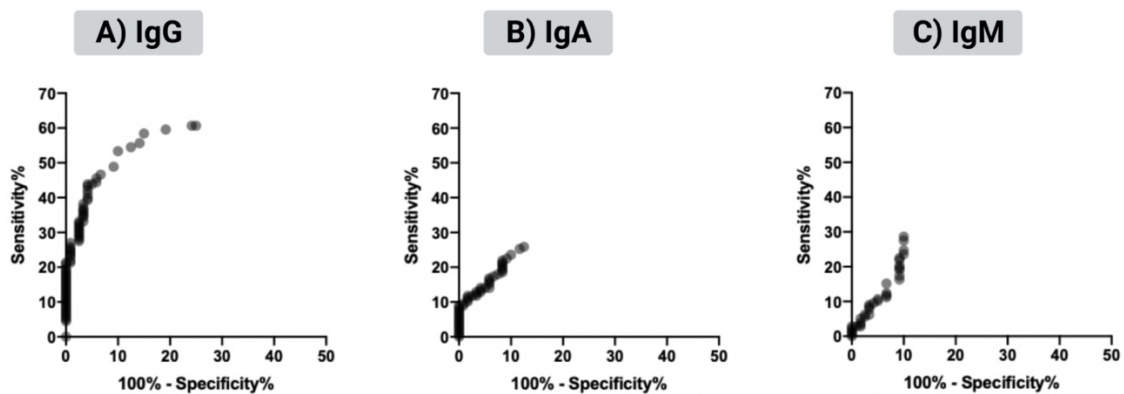


Figura 61: Corbes ROC del pèptid CFFHP pels diferents isotips. Calculades amb els resultats obtinguts de la mostra de 178 pacients d'AR en comparació a 120 mostres d'individus sans.

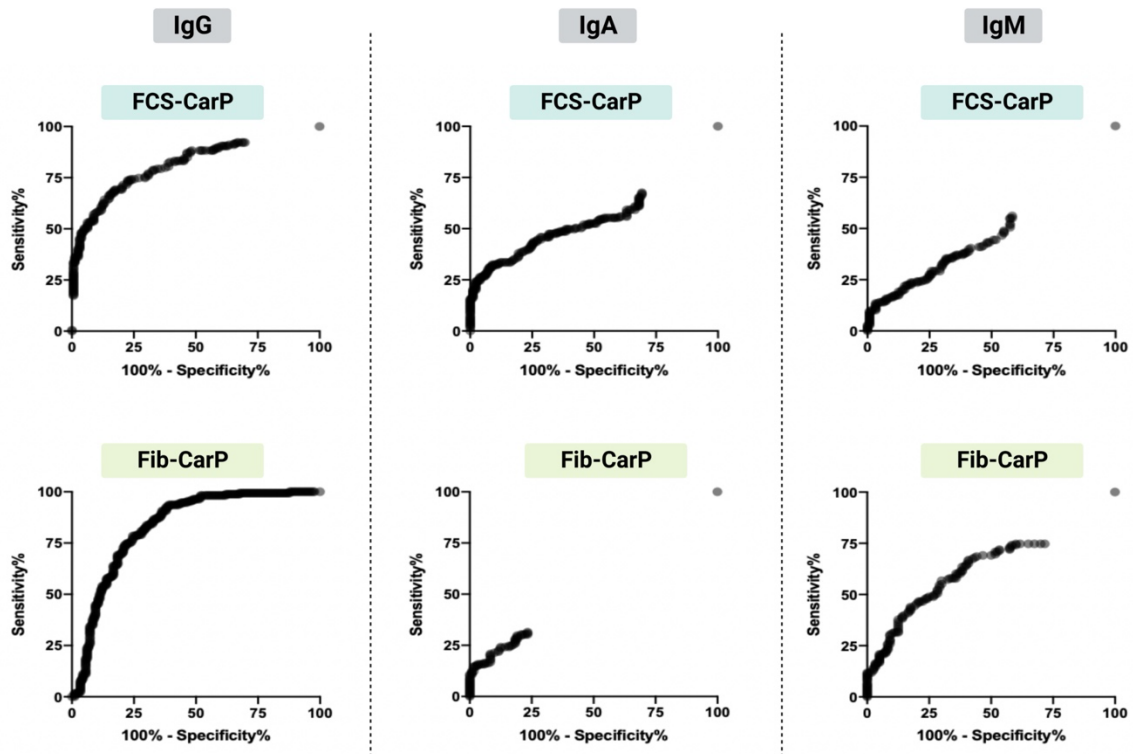


Figura 62: Corbes ROC del dos antígen proteics: FCS-CarP i Fib-CarP pels diferents isotips. Calculades amb els resultats obtinguts de la mostra de 178 pacients d'AR en comparació a 120 mostres d'individus sans.

A)	IgG	IgA	IgM
Anti-CFFCHP-1	≥18,0	≥20,5	≥52,5
Anti-CFFCHP-2	≥15,0	≥21,5	≥60,0
Anti-CFFCHP-3	≥17,5	≥26,5	≥84,5
Anti-CFFHP	≥13,5	≥26,5	≥21,5
Anti-CFFCHAP	≥19,5	≥25,5	≥42,5
B)	IgG	IgA	IgM
Anti-FCS-CarP	≥173,5	≥257	≥222,5
Anti-Fib-CarP	≥166,9	≥89	≥144,5

Taula 29: Valors dels punt de tall de positivitat emprats en les determinacions de la presència d'AMPAs duts a terme amb diferents antígen. (A) Valors dels punts de tall dels antígen peptídics. (B) Valors dels punts de tall dels antígen proteics.

4.3 Comparació de les poblacions d'anàlisi

L'anàlisi de les característiques de les poblacions d'anàlisi es mostra a continuació:

- 1) **Cohort 1:** 45 pacients de reumatisme palindròmic inclosos en l'estudi clínic PALABA (NCT03669367). Són casos de diagnòstic recent que no han rebut cap tractament previ.
- 2) **Cohort 2:** 125 pacients d'AR establerta. El diagnòstic es va fer d'acord als criteris ACR/EULAR 2010. Per tal de poder dur a terme la comparació amb la població de RP de recent diagnòstic, es van excloure de la mostra aquells pacients que havien rebut com a tractament Rituximab (tractament basat en l'ús d'un anticòs quimèric monoclonal que té com a diana el receptor CD20 de les cèl·lules B) o Abatacept (tractament basat en l'ús d'una proteïna de fusió formada amb la regió Fc de l'immunoglobulina G1 i el domini extracel·lular de CTLA-4 que té com a diana el receptor CD80 i CD86 de les cèl·lules T).

La resta de característiques principals de les dues cohorts es descriuen a la Taula 30. No es van trobar diferències significatives en els dos grups, ni en el % de dones, ni l'edat, ni respecte el % de positivitat del FR ni de la positivitat ACPA, determinada amb el test comercial CCP2.

	RP (n=45)	AR (n=125)
Dones	34 (75,6)	97 (77,6)
Edat (anys)	49,3±11	59,6±13
Durada malaltia (mesos)	9,6±6,1	77,2±59,7
Factor reumatoide	36 (80)	97 (77,6)
ACPA (anti-CCP2)	41 (91,1)	110 (88)

Taula 30: Comparació de les dades principals de les dues cohorts d'anàlisi: RP (n=45) vs AR (n=125). Es mostren les dades de les dues cohorts. Els resultats dels apartats de Dones, FR i ACPA s'expressen en números absoluts i percentatge de positius respecte el total, n(%). Els resultats d'edat i durada malaltia s'expressen en anys i mesos respectivament i es corresponen a la mitjana ± desviació estàndard.

4.4 Resultats comparatius de la resposta AMPA en les dues poblacions d'anàlisi

Es va dur a terme l'anàlisi de la presència d'anticossos del tipus AMPA (ACPA, anti-CarP i AAPA) en els isotips IgG, IgA i IgM. Per els assaigs de determinació es van emprar diferents antígens, tant peptídics com proteics. Entre els antígens peptídics es van incloure els pèptids doblement modificats (citrul·linats/homocitrul·linats) CFFCHP-1, CFFCHP-2 i CFFCHP-3, descrits i analitzats en apartats anteriors. També es va incloure el pèptid totalment homocitrul·linat CFFHP, i el pèptid triplement modificat, CFFCHAP. Pel que fa a les proteïnes carbamilades, es van incloure el FCS i el fibrinogen, caracteritzats i descrits en apartats anteriors. En tots els casos es va treballar de forma paral·lela amb els antígens en la seva versió no modificada per tal de determinar la reactivitat específica.

4.4.1 Comparació de la positivitat AMPA en les dues cohorts

En la comparació de les proporcions de positivitat de les dues poblacions amb els diferents antígens d'anàlisi es van observar diferències significatives principalment en els antígens carbamilats. En tots els casos on es van observar diferències significatives de positivitat entre els dos grups, es va confirmar que la resposta era major en el grup d'AR i que la positivitat estava reduïda en la població de RP. En altres casos es va observar la mateixa tendència però sense poder arribar a confirmar-la de forma estadísticament significativa.

En el cas del FCS-CarP es van observar diferències significatives en els isotips IgG i IgA ($p < 0,005$) mentre que en l'isotip IgM es va observar una tendència similar però sense assolir la significació estadística ($p = 0,067$). Per altra banda, en el cas del Fib-CarP es va confirmar la presència de diferències significatives en l'isotip IgG ($p < 0,0001$) mentre que en el cas dels altres dos isotips, no es van observar aquestes diferències. Pel que fa a l'últim antigen totalment carbamilat, el pèptid CFFHP, també es van confirmar les diferències en els isotips IgG i IgA ($p < 0,05$) mentre que l'isotip IgM només es va observar la tendència però sense assolir la significació estadística ($p = 0,1832$), de forma similar a com s'havia observat amb l'FCS-CarP (Taula 31).

Pel que fa a la resta d'antígens emprats, només es van poder observar diferències estadísticament significatives en els nivells de positivitat observats en front a dos dels pèptids doblement modificats (CFFCHP-2 i CFFCHP-3) en realitzar l'anàlisi de la presència d'anti-AMPA-IgA. No es van observar diferències estadísticament significatives per cap de les altres parelles d'antigen/isotip (Taula 32).

4.4.2 Comparació dels nivells d'AMPA en les dues cohorts

No es van observar diferències significatives en els nivells d'ACPAs ni en el percentatge de positivitats entre les dues poblacions (AR i RP). Es van observar diferències significatives principalment en referència als nivells observats de resposta anti-CarP. Els nivells d'aquesta família d'autoanticossos estava elevat en la població d'AR respecte la dels pacients de RP, que mostra una resposta més restringida.

L'antigen en el que es va observar una major diferència va ser novament el FCS-CarP. Els nivells en front a aquest antigen estaven disminuïts en la població de RP pels 3 isotips d'estudi, i la diferència respecte la població d'AR era significativa en tots els casos (IgG i IgA, $p < 0,0001$ i IgM $p < 0,0005$). Aquest fet es va replicar amb el Fib-CarP en els isotips IgG i IgA ($p < 0,0005$) però no en l'isotip IgM, on no es van poder detectar diferències entre els dos grups. Pel que fa al pèptid totalment carbamilat, CFFHP, es van observar diferències significatives en els isotips IgG i IgM ($p < 0,05$) mentre que en l'isotip IgA es va observar una tendència similar però sense assolir la significació estadística ($p = 0,112$) (Taules 31 i 32) (Figura 63).

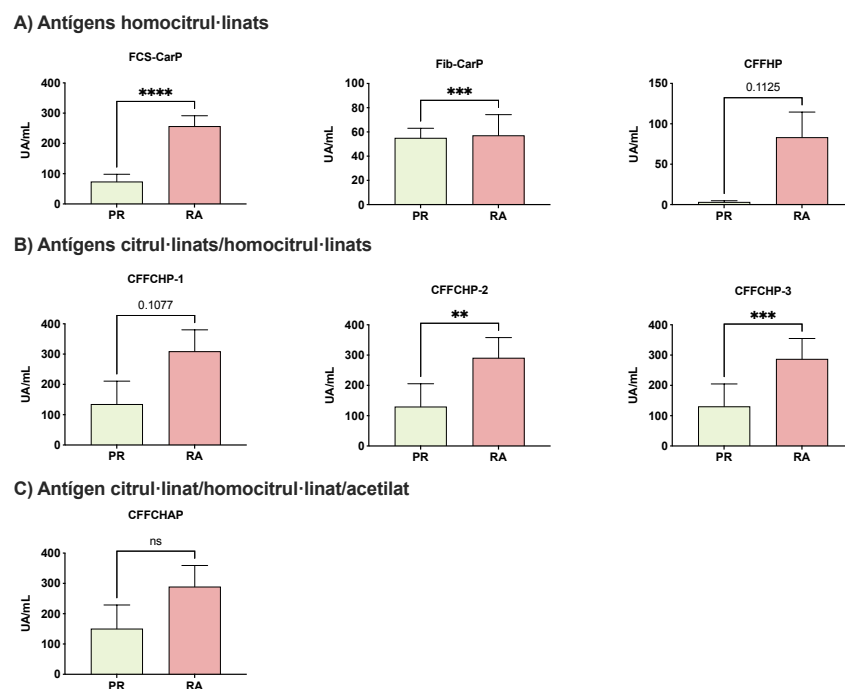


Figura 63: Comparació dels nivells anti-CarP-IgA o anti-AMPA-IgA en els pacients de RP i AR emprant diferents antígens. (A) Resultats obtinguts emprant els antígens carbamilats FCS-CarP, Fib-CarP i CFFHP. (B) Resultats obtinguts emprant els antígens peptídics doblement modificats (citrul·linats/homocitrul·linats) CFFCHP-1, CFFCHP-2 i CFFCHP-3. (C) Resultat obtingut emprant l'antigen peptídic triplement modificat, CFFCHAP. ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ i **** indica $p < 0,0001$.

	AR (n=125)	RP (n=45)	p valor
FCS homocitrul·linat (FCS-CarP)			
Positivitat (%) IgG anti-FCS-CarP	78 (62.4)	14 (31.1)	p<0.005
Mediana dels nivells anti-FCS-CarP (IQR) UA/mL	238 (571)	75 (249)	p<0.001
Positivitat (%) IgA anti-FCS-CarP	41 (32.8)	2 (4.4)	p<0.005
Mediana dels nivells anti-FCS-CarP (IQR) UA/mL	161 (308)	14 (97)	p<0.001
Positivitat (%) IgM anti-FCS-CarP	30 (24.0)	5 (11.1)	NS
Mediana dels nivells anti-FCS-CarP (IQR) UA/mL	90 (165)	32 (101)	p<0.005
Fibrinogen homocitrul·linat (Fib-CarP)			
Positivitat (%) IgG anti-Fib-CarP	87 (69.6)	9 (20)	p<0.005
Mediana dels nivells anti-Fib-CarP (IQR) UA/mL	249 (304)	70 (104)	p<0.005
Positivitat (%) IgA anti-Fib-CarP	25 (20.0)	10 (22.2)	NS
Mediana dels nivells anti-Fib-CarP (IQR) UA/mL	0 (76)	36 (72)	p<0.005
Positivitat (%) IgM anti-Fib-CarP	33 (26.4)	8 (17.8)	NS
Mediana dels nivells anti-Fib-CarP (IQR) UA/mL	82 (117)	57 (84)	NS
Pèptid quimèric de fibrina/filagrina homocitrul·linat (CFFHP)			
Positivitat (%) IgG anti-CFFHP	54 (43.2)	10 (22.2)	p<0.05
Mediana dels nivells anti-CFFHP (IQR) UA/mL	9 (227)	0 (12)	p<0.005
Positivitat (%) IgA anti-CFFHP	20 (16.0)	1 (2.2)	p<0.05
Mediana dels nivells anti-CFFHP (IQR) UA/mL	0 (5)	0 (0)	NS
Positivitat (%) IgM anti-CFFHP	14 (11.2)	2 (4.4)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFHP (IQR) UA/mL	0 (7)	0 (0)	p<0.05

Taula 31: Positivitat i nivells mitjans de la resposta anti-CarP en els pacients d'AR vs RP de recent diagnòstic analitzada amb els diferents antígens.

En els altres antígens testats només es van veure diferències estadísticament significatives per dues de les molècules doblement modificades, en l'isotip IgA, en les quals s'havia mostrat també la presència d'aquestes diferències en termes de positivitat. En aquests dos pèptids, per l'isotip IgA, el p-valor va ser inferior a 0,05. També en l'isotip IgA, amb el pèptid CFFCHP-1 es va observar la tendència en el mateix sentit però en aquest cas no es va arribar a la significació estadística (p=0,108) (Figura 63). En l'isotip IgG es va observar una tendència similar pels tres pèptids homocitrul·linats/citrul·linats. Amb el pèptid CFFCHAP, que presenta també acetil lisina, els resultats no mostren diferències significatives per cap dels 3 isotips (Taula 32).

	AR (n=125)	RP (n=45)	p valor
Pèptid quimèric de fibrina/filagrina citrul-linat/homocitrul-linat 1 (CFFCHP-1)			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-1	89 (71.2)	25 (55.5)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	122 (697)	113 (384)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-1	53 (42.4)	12 (26.7)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	11 (113)	2 (39)	NS
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-1	34 (27.2)	13 (28.9)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-1 (IQR) UA/mL	0 (105)	0 (69)	NS
Pèptid quimèric de fibrina/filagrina citrul-linat/homocitrul-linat 2 (CFFCHP-2)			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-2	89 (71.2)	25 (55.5)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	130 (891)	140 (441)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-2	59 (47.2)	12 (26.7)	p<0.05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	17 (129)	2 (43)	p<0.05
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-2	38 (30.4)	10 (22.2)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-2 (IQR) UA/mL	0 (101)	0 (43)	NS
Pèptid quimèric de fibrina/filagrina citrul-linat/homocitrul-linat 3 (CFFCHP-3)			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHP-3	89 (71.2)	26 (57.8)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	153 (767)	95 (478)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHP-3	56 (44.8)	12 (26.7)	p<0.05
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	23 (107)	4 (54)	p<0.005
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHP-3	37 (29.6)	7 (15.6)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHP-3 (IQR) UA/mL	0 (117)	8 (36)	NS
Pèptid quimèric de fibrina/filagrina citrul-linat/homocitrul-linat/acetilat (CFFCHAP)			
Positivitat (%) IgG anti-CFFCHAP	81 (64.8)	27 (60.0)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	61 (786)	75 (516)	NS
Positivitat (%) IgA anti-CFFCHAP	50 (40.0)	13 (28.9)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	11 (126)	8 (69)	NS
Positivitat (%) IgM anti-CFFCHAP	38 (30.4)	13 (28.9)	NS
Mediana dels nivells anti-CFFCHAP (IQR) UA/mL	0 (58)	0 (61)	NS

Taula 32: Positivitat i nivells mitjans de la resposta anti-AMPA en pacients d'AR vs RP de recent diagnòstic analitzada amb els diferents antígens.

Així doncs, es va observar com de forma clara, tot i presentar nivells comparables tant de FR com d'ACPA, detectats amb el test CCP2, es mostren diferències clares pel que fa a la presència i nivells d'anti-CarP. Es mostra com hi ha una menor resposta en el grup de pacients de RP tant pel que fa als nivells i presència com al tipus d'isotips detectats en comparació al grup d'AR. L'absència de resposta IgA, i especialment anti-CarP, detectada en pacients de RP de recent diagnòstic podria estar relacionada amb una menor progressió cap a l'AR.

Discussió

El diagnòstic actual de l'AR està basat en múltiples manifestacions clíniques i només en dos paràmetres serològics, la determinació de dues famílies d'anticossos, els ACPA i el FR. El gran avenç que s'ha donat en els últims anys respecte la detecció de la presència de diferents famílies d'autoanticossos està posant en relleu la necessitat de desenvolupar nous tests serològics que permetin la determinació de la resposta anti-AMPA de forma sensible, específica i reproduïble. La manca de tests serològics es fa especialment rellevant en els fenotips greus de la malaltia, on la resposta immunitària és més elevada i detectar el component humoral pot tenir més rellevància pel diagnòstic i correcta estratificació dels pacients en funció de la necessitat del tractament.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral, ha estat el disseny i síntesi de múltiples nous antígens per desenvolupar nous tests basats en suports sòlids diversos amb l'objectiu final de millorar la detecció de diferents biomarcadors amb rellevància en el context de l'AR. L'estudi d'aquests biomarcadors alhora ha servit per ajudar a entendre com la presència d'aquests pot afectar i/o contribuir a les afectacions mostrades pels pacients d'aquesta patologia.

Donat que els ACPA formen, juntament amb el FR, el doblet d'anticossos amb potencial diagnòstic més elevat en el context de l'AR, i que semblen estar involucrats en la fisiopatologia de la malaltia, l'estudi d'aquests va ser el punt de partida dels estudis dels biomarcadors d'AR que s'han inclòs en aquesta tesi. Els resultats obtinguts en assajos previs ens van permetre plantejar, com a primer objectiu, el disseny d'un suport múltiplex per la detecció i estudi de la resposta ACPA envers múltiples antígens peptídics quimèrics, cíclics i citrul·linats de forma simultània en pacients d'AR. En termes globals, tot i que no tots els resultats prèviament obtinguts individualment per cadascun dels pèptids en format ELISA han estat reproduïts en el nou format microarray, el balanç final entre sensibilitat i especificitat assolit amb el format microarray es pot considerar adequat.

L'assaig ha confirmat que és possible treballar de forma simultània amb diverses estructures peptídiques diferents en un únic assaig i mantenir la reactivitat observada en altres plataformes com és l'ELISA. Ens ha servit com una prova de concepte per confirmar la validesa del format microarray en el context de la recerca i anàlisi d'estructures peptídiques diferents.

L'objectiu inicial de l'estudi era el desenvolupament d'un test múltiplex ja que aquest format presenta algunes avantatges molt rellevants, com l'estalvi de temps per l'estudi de múltiples estructures però sobretot la necessitat de fer servir menys reactius. Aquest punt és clau sobretot en el cas dels sèrums dels pacients, ja que presenta un valor biològic incalculable i en moltes

ocasions és escàs. Disminuir la quantitat necessària del sèrum pot permetre incloure en els estudis mostres molt ben caracteritzades pel que fa a l'historial clínic, però de les quals es disposa de molt poc volum, que poden ser de molta utilitat en recerca.

L'obtenció de bons resultats en l'assaig global depèn en gran part en els antígens individuals inclosos i les seves característiques individuals. Malgrat que s'han desenvolupat sistemes miniaturitzats que permeten la presentació d'antígens de naturalesa diversa i en els quals es poden incloure tant proteïnes com pèptids de forma simultània, com els que es presenten en els estudis de detecció d'ACPAs realitzats per Wagner et al³⁵⁶ o Chandra et al³⁵⁷, en aquest projecte es va decidir treballar exclusivament amb molècules de naturalesa peptídica. El motiu pel qual es va prendre aquesta decisió va ser la possibilitat d'efectuar de forma senzilla una caracterització completa dels pèptids abans de ser emprats com antígens. La identificació de cada pèptid i la seva obtenció amb un elevat grau de puresa (>95%) suposen un punt essencial per poder descartar fonts de divergències en la comparació dels resultats obtinguts en els estudis d'ELISA i els obtinguts en el microarrays, alhora que ens assegurem que la resposta detectada és específica a l'antigen presentat.

La selecció dels pèptids concrets per l'assaig ha estat guiada per dos factors importants. En primer lloc, totes les estructures peptídiques que es van estudiar i contemplar com a candidates per formar part d'aquest assaig van estar dissenyades per mostrar dos dominis de proteïnes diferents alhora. La raó d'escollir l'ús de pèptids quimèrics en detriment dels pèptids monomèrics va ser la major reactivitat observada en diversos estudis realitzats prèviament al nostre laboratori^{141,216,358,359}. Més concretament, pel disseny de cada pèptid quimèric es va treballar amb diferents dominis que van ser escollits per la seva rellevància en el diagnòstic actual de l'AR, com és el cas del pèptid de filagrina¹⁴⁰ o bé perquè són derivats de proteïnes que s'han detectat en el teixit sinovial de pacients d'aquesta patologia, com ha estat el cas de l'enolasa³⁴⁶, la vimentina³⁶⁰⁻³⁶² i la fibrina^{363,364}. La utilització de fragments de proteïnes presents en el teixit sinovial de pacients d'AR com antígens podria ajudar a millorar la sensibilitat de l'assaig.

En segon lloc, tots els pèptids que es van incloure a l'assaig múltiple havien estat prèviament validats en el suport d'ELISA. D'aquesta manera es va poder determinar que generaven una reactivitat i que la resposta anti-ACPA que permetien detectar presentava una sensibilitat i especificitat suficients per ser incloses en el microarray. La inclusió de pèptids amb capacitat de detectar ACPAs de forma individual és crítica per tal de generar una combinació òptima de pèptids, que estudiats de forma conjunta, també donin un bon resultat pel que fa a la sensibilitat

i a l'especificitat. Wagner et al³⁵⁶ van mostrar com d'un total de 16 antígens citrul·linats estudiats, només 8 mostraven de forma preferencial una resposta, mentre que la resta mostraven una reactivitat molt més baixa. La inclusió de la resta d'antígens no mostrava cap informació addicional. En un altre assaig realitzat per Rönnelid et al³⁶⁵, es va mostrar també que amb els resultats dels 8 pèptids més reactius del total de 16 pèptids inclosos, s'obtenien millors resultats.

Finalment, una vegada feta l'elecció dels pèptids que s'havien d'incloure en el disseny final del múltiple, l'optimització prèvia del protocol del microarrays va ser clau en el desenvolupament dels assaigs posteriors. Tal i com s'ha vist en els assaigs de comparació de les diferències obtingudes en relació al protocol emprat, treballar amb els reactius més adequats per unir el pèptid al portaobjectes permet obtenir resultats més homogenis. L'optimització va permetre obtenir resultats acceptables en termes de coeficient de variabilitat de cadascun dels spots dels pèptids en la majoria dels casos de tal manera que es van obtenir resultats vàlids de suficients pacients d'AR, donants de banc de sang i PsA per poder determinar tant la sensibilitat com l'especificitat de cadascun dels pèptids d'assaig.

També van mostrar clarament com en les mostres de baixa intensitat, la variabilitat dels spots era major i la homogeneïtat estava reduïda. Els resultats obtinguts en el nostre assaig ens van servir per determinar el valor límit de CV acceptable per la inclusió dels resultats en l'assaig final. Aquests valors van ser del 25% en les mostres d'alta intensitat i del 30% en les de baixa intensitat i són valors límit equiparables als descrits en altres estudis de disseny múltiple per la detecció d'ACPAs, com és el cas l'estudi de Hansson et al³²⁵, on es troben amb CV d'entre el 10 i 20% en les mostres d'alta intensitat i entre el 15 i el 32% en el cas de mostres de baixa intensitat. Es tracten també de valors propers als obtinguts, de fins el 17%, en la comparació de diferents tests comercials CCP2 reportats per Bizzarro et al³⁶⁶.

Un dels punts forts del nostre assaig va consistir en la inclusió de pèptids control amb arginina per cadascun dels pèptids citrul·linats de l'assaig. Això és molt rellevant ja que ens va permetre comprovar que la reactivitat observada en front als diferents pèptids citrul·linats es devia precisament a la presència de la PTM. Suposa un avantatge respecte el test comercial, que està basat en la presentació d'una multitud d'estructures citrul·linades de forma simultània seguint una metodologia que impossibilita la inclusió dels pèptids controls amb arginina de forma rutinària. De fet, suposa un punt dèbil de l'assaig comercialitzat, ja que per aquest motiu, en ocasions s'han detectat respostes positives en mostres on la reactivitat no es específica de la citrul·lina.

Aquesta resposta inespecífica s'ha descrit en diferents assaigs, com el de Kakumanu et al³⁶⁷ en el qual s'analitza la resposta anti-CCP1 de pacients d'AR i de pacients de tuberculosi, que és, *a priori*, detectable en el 43% i 37% dels sèrums analitzats de cada patologia respectivament. En realitzar l'anàlisi de la resposta al mateix pèptid però contenint arginines, van observar clarament com els pacients de tuberculosi presenten també reactivitat al pèptid control, fet que no es replica en els pacients d'AR. D'aquesta manera, es pot concloure que la resposta en el cas dels pacients d'AR és específica de la presència de citrul·lina mentre que en el grup de tuberculosi, la resposta no és específica a la citrul·lina, i l'ús d'un test que serveixi per detectar aquest biomarcador sense emprar un pèptid que conté arginines com a control pot generar confusió.

Altres estudis posteriors en la mateixa línia, emprant el test CCP2 i plaques de control proveïdes per l'empresa fabricant EuroDiagnostica, han permès concloure que pacients d'hepatitis autoimmune de tipus 1³⁶⁸ i pacients que presenten infecció per *Leishmania donovani*³⁶⁹ també presenten reactivitat al test CCP2 i que aquesta és, novament, inespecífica de la citrul·lina. Tot i que aquesta reactivitat es podria confondre per una resposta específica ACPA, la resposta no té aquesta naturalesa ja que s'observa també en la placa en la que s'exposen els pèptids en la seva versió control (amb arginina). Aquests estudis posen èmfasi en la importància d'emprar els controls adequats per poder assegurar l'especificitat envers la citrul·lina de la resposta detectada.

L'estudi de l'efecte individual de la subtracció de la reactivitat del pèptid control a cadascun dels pèptids en el nostre estudi, va donar resultats diferents. La tendència general va ser clara, ja que en 5 dels 8 pèptids de l'assaig, tenir en compte el pèptid control va permetre millorar la sensibilitat individual del pèptid. En dos dels casos, aquesta operació no va generar cap efecte i en un únic pèptid, va fer disminuir la sensibilitat, tot i que de forma molt minsa, del 36% fins al 31%. Aquest efecte es va observar en el pèptid CFVCP, que alhora era el pèptid amb la pitjor capacitat diagnòstica (sensibilitat més baixa) dels vuit inclosos a l'assaig. La pèrdua de sensibilitat de forma moderada degut a la inclusió del control observada en el nostre assaig també s'ha descrit en altres assaigs similars com el de Hansson et al³²⁵. En aquest estudi es va treballar amb un total d'11 pèptids citrul·linats i van detectar una baixada moderada de la sensibilitat en 6 dels pèptids quan es restava la resposta del pèptid control, amb un percentatge de sensibilitat perduda que va oscil·lar entre el 2 i el 4% aproximadament, uns valors molt propers a l'observat en el nostre estudi, pel pèptid CFVCP (5%).

En aquest aspecte es pot concloure que la inclusió dels controls és una eina que va permetre millorar el rendiment de l'assaig. El motiu pel qual es va donar de forma general un augment de la sensibilitat, és que la inclusió del control permet, quan en fas la subtracció respecte de la reactivitat total, descartar la reactivitat inespecífica. Aquesta es sol donar de forma majoritària en el grup control. Així, de forma global els controls donen valors menys elevats de reactivitat i el punt de tall disminueix, permetent la detecció de més casos positius en la població d'AR mentre es manté l'especificitat. La millora del rendiment individual de cadascun dels pèptids contribueix a que el resultat global també sigui millor.

Un cop obtingudes les dades definitives que van servir per analitzar els resultats i la capacitat diagnòstica tant de cada pèptid individual com de l'assaig global, es van dur a terme diferents comparacions. En primer lloc, es va analitzar mitjançant el càlcul del coeficient de Spearman si la resposta obtinguda amb el suport ELISA de cada pèptid era comparable amb l'obtinguda en el microarray. Els coeficients de correlació van ser elevats, d'entre el 0,7 i el 0,83, confirmant la concordança obtinguda entre els dos tipus d'assaig i la seva correlació. Aquests resultats, a més, estan en línia amb els obtinguts en comparacions d'ELISA vs microarrays dutes a terme en altres estudis de quantificació d'anticossos contra proteïnes específiques^{325,370}. D'aquesta manera es va comprovar que el "trasllat" d'un suport sòlid a l'altre s'havia donat de forma exitosa.

La següent anàlisi es va centrar en els resultats obtinguts pel que fa a la positivitat. Es va dur a terme la comparació del nombre de pèptids positius de forma simultània dels diferents pacients i els nivells de CCP3 que presentaven. També en aquest cas es va poder establir que existia una correlació estadísticament significativa ($p=0,0023$). Això va permetre confirmar que els pacients que presentaven nivells més alts de CCP3, també mostraven una reactivitat envers a un major nombre d'epítops de la nostra plataforma. Amb aquests resultats vam poder comprovar que en algunes de les mostres d'AR establerta es presenta un major rang d'epítops reconeguts, i alhora està relacionat amb la major resposta al test comercial, tal i com s'havia descrit prèviament^{65,371}.

L'ús dels resultats del test CCP3 en els pacients de la nostra cohort com a referència ens va permetre determinar els criteris òptims per establir el punt de tall de positivitat global del multiplex. L'ús de gold-standard com a referència també ens va permetre determinar si l'exclusió dels pèptids que prèviament mostraven una menor sensibilitat individual influïa en la sensibilitat global i de quina manera ho feia. La comparació dels resultats emprant 5, 6 o 8 pèptids va mostrar que, contrari al que podíem sospitar al principi, la inclusió de tots els pèptids permetia tenir una major sensibilitat, ja que aquesta era del 65% en l'anàlisi realitzat tenint en compte 5 dels pèptids

i va augmentar fins a 77% amb la inclusió de 8 pèptids en tots dos casos mantenint una especificitat del 91% (en referència al test CCP3). Aquests resultats van mostrar que la inclusió de pèptids diversos és crítica ja que tal i com s'ha reportat en la literatura, el ventall d'epítops reconeguts pels pacients d'AR és ampli i difereix entre individus i entre fases de la malaltia^{63,372}.

El fet que treballar amb 8 pèptids doni millors resultats que només incloure'n 5 o 6 es pot interpretar també com que l'assaig per validar els pèptids de forma prèvia a la inclusió en el múltiplex ha estat exitós i s'han escollit en tots els casos estructures adients. En el nostre cas, tots els pèptids han aportat informació i han contribuït a la capacitat diagnòstica global del test, a diferència del que s'ha vist en els assaigs que s'han mencionat prèviament de Wagner et al³⁵⁶ i Rönnelid et al³⁶⁵, en els quals hi havia 8 pèptids que aportaven la majoria d'informació mentre que els 8 restants tenien menys rellevància.

Aquests mateixos estudis comparant els resultats obtinguts en el múltiplex en diferents condicions emprant de referència el test CCP3 van permetre concloure que el punt de tall òptim era el de ≥ 3 pèptids. Aquest punt de tall ens permetia obtenir resultats amb una especificitat considerablement més elevada. La sensibilitat respecte els resultats obtinguts amb el test CCP3, en aquest cas, arribava a valors propers al 75% amb una especificitat del 91%, mentre que en les condicions menys restrictives (positivitat amb ≥ 2 positius simultanis) la sensibilitat era més alta, del 86%, però l'especificitat era marcadament inferior, 64%.

Imposar un punt de tall més restrictiu va permetre obtenir una especificitat més elevada, necessària per discriminar correctament l'artritis d'altres patologies, com es demostra també en el treball realitzat per Wagner et al³⁵⁶. En aquest, la determinació el test com a positiu tenint en compte un sol biomarcador donava un valor de 70% de sensibilitat però amb una especificitat molt baixa, del 50% i augmentant el nombre de marcadors positius simultanis requerits per la positivitat global fins a ≥ 4 , la sensibilitat disminueix fins al 57% però l'especificitat augmenta fins al 96%. Tenint en consideració el tipus de múltiplex que s'està dissenyant, que té com a objectiu la discriminació correcta de pacients d'AR respecte altres patologies, l'especificitat s'ha d'establir sempre en el valor més alt possible.

Els canvis en l'assaig han de buscar augmentar la sensibilitat però mantenint l'especificitat. Així doncs, s'ha d'intentar assolir el millor equilibri entre sensibilitat i especificitat. Utilitzant un punt de tall de ≥ 3 pèptids positius en el nostre assaig, la sensibilitat global del múltiplex va ser

acceptable, del 61,4%. La resposta observada emprant aquest punt de tall, a més, era molt específica ja que en les poblacions control, tant en les mostres del banc de sang com en les mostres de pacients de PsA, no es va detectar cap pacient que presentés positivitat en front a com a mínim tres pèptids. La capacitat diagnòstica global del test va ser bona, ja que va presentar una acceptable sensibilitat i una òptima especificitat.

Novament, aquests resultats són comparables ($p=0,81$) amb els obtinguts amb altres plataformes múltiplex, com la descrita per Wagner et al³⁵⁶, on emprant un major nombre d'antígens, 16, i testant un gran nombre de mostres (1983 mostres d'AR i 249 controls) obtenen una sensibilitat del 63% i una especificitat del 98%. Coincideixen també amb estudis posteriors, més recents³⁶⁵, en que també amb 16 pèptids s'obté una sensibilitat una lleugerament major (68,1%) i una especificitat lleugerament menor (95,1%).

Dels 66 casos diagnosticats clínicament amb AR, amb el test CCP3 es van detectar 53 casos (80%) de pacients mentre que amb el múltiplex se'n van detectar 40 (61,4%). La sensibilitat del múltiplex és inferior a la del gold-standard CCP3. Aquest resultat va indicar que tot i que l'objectiu principal, que consistia en realitzar tests que permetessin la detecció d'ACPAs en un assaig múltiplex, s'havia completat amb èxit, encara quedava marge de millora per augmentar la sensibilitat. En la comparació de positivitat individual de cada sèrum en els dos assaigs, es van observar resultats discordants en 14 casos. De forma majoritària es va observar que eren positius per CCP3 i negatius en el múltiplex (13/14) i només un dels casos era positiu en el múltiplex i negatiu en el test CCP3.

Aquests resultats novament fan posar èmfasi en l'àmplia heterogeneïtat que existeix en els epítops reconeguts pels ACPA. En el nostre cas s'ha treballat amb estructures ben caracteritzades per la detecció d'ACPAs en una cohort d'AR establerta, en la qual en principi s'ha donat ja la expansió d'epítops reconeguts. Amb els resultats aquí presentats vam demostrar que s'havia dissenyat un sistema base i una metodologia adequada sobre la qual ara es podrà treballar i millorar amb la inclusió de diferents antígens per tal d'augmentar-ne la seva utilitat. A més, el nostre disseny múltiplex s'hauria de testar amb nombres més grans de pacients per confirmar els resultats. També es podria incloure altres cohorts de pacients d'AR com poden ser els d'AR en estadis inicials per determinar-ne la seva capacitat diagnòstica en aquest context. És d'esperar que els resultats serien més limitats, tal i com s'ha pogut observar en l'estudi de Brink et al³⁷³ en el qual s'ha demostrat que emprant el mateix disseny múltiplex, s'observen diferències clares en la sensibilitat entre dues poblacions de pacients (AR d'inici vs AR establerta).

En conclusió, els resultats obtinguts en aquest assaig demostren que és factible la utilització de microarrays preparats de forma manual al laboratori per l'estudi de la presència d'anticossos en diferents contextos. Han de servir com a base per el desenvolupament de nous dissenys en els quals es poden incloure no només pèptids amb citrul·lina sinó modificats amb altres PTMs rellevants en l'AR, per explorar la resposta AMPA en diferents cohorts i en relació a característiques clíniques que presentin els pacients inclosos en l'assaig.

Aquests resultats positius en relació a la utilització de microarrays ens van permetre establir que la base per generar tests múltiple era la correcta però alhora ens van servir per entendre que la resposta analitzada podia ser ampliada i no només centrar-se en la resposta ACPA. Per poder fer un estudi més ampli de la resposta i així detectar i analitzar diferents biomarcadors (anti-CarP, AAPA), es va dur terme el disseny i síntesi de nous pèptids quimèrics amb aminoàcids amb PTMs diverses (citrul·linació, homocitrul·linació i acetilació) que ens permetessin ampliar el repertori d'antígens i poder així analitzar la resposta AMPA en una cohort de pacients d'AR amb característiques clíniques ben definides. El desenvolupament de nous antígens, que dona lloc al segon apartat, ha permès identificar una associació de la presència de diferents paràmetres indicatius de malaltia greu en l'AR i la presència d'una resposta més àmplia i en nivells més alts d'AMPAs.

Gràcies a l'ús de pèptids amb múltiples PTMs hem pogut establir que els pacients que presenten una manifestació extra-articular que afecta als pulmons, la malaltia pulmonar intersticial, presenten en general nivells més elevats d'AMPAs i, que en comparació amb la població d'AR general, la positivitat en aquests tipus d'autoanticossos s'hi troba també significativament elevada. També es va poder identificar una relació entre els nivells més alts d'AMPAs i la presència de malaltia erosiva greu.

Per poder dissenyar els diferents pèptids emprats com antígens en aquest estudi, ens vam basar en diferents resultats previs del nostre grup de recerca. Més concretament es va posar el focus en diferents estudis centrats en l'anàlisi de diferents combinacions quimèriques que van demostrar que la unió covalent d'un pèptid α -fibrina (617-631) amb una citrul·lina a la posició 630 al pèptid cíclic de filagrina que constitueix el test comercial de primera generació (CCP1), donava lloc a la millor combinació d'epítops per detectar reactivitat en els pacients d'AR, el pèptid CFFCP-1^{142,261}. L'ús d'aquest pèptid quimèric com antigen permet detectar la presència d'ACPAs amb una sensibilitat i especificitat comparable a la del test CCP2, i presenta una millor capacitat

d'identificar pacients amb mal pronòstic en relació al dany articular^{142,261}. L'estructura primària del CFFCP-1 va servir com a base pel disseny i síntesi diferents antígens peptídics en els quals es va introduir en primera instància l'homocitrul·lina, substituint un o els dos aminoàcids lisina presents en l'estructura nativa del pèptid i finalment una acetil lisina, també en un dels dos residus de lisina on no hi havia homocitrul·lina.

Tot i que la citrul·linació és la modificació post-traducciona més rellevant en l'AR, la inclusió de noves modificacions en els nostres pèptids com l'homocitrul·linació i l'acetilació, ens pot ajudar a entendre el rol que aquestes executen en el context fisiopatològic de l'AR³⁷⁴. Més concretament, la presència d'anti-CarP, els anticossos dirigits a l'homocitrul·lina, ha estat relacionada amb una elevada activitat patogènica en l'AR^{182,375}. S'ha descrit la seva presència en fins al 20% de pacients seronegatius d'AR^{80,376} i per tant podrien aportar un valor diagnòstic afegit en la detecció i la sensibilitat de l'assaig si s'utilitzen de forma combinada amb antígens citrul·linats.

Així doncs, la introducció d'aquest nou aminoàcid en els pèptids que mantenen la citrul·lina a la seva estructura ha de permetre detectar de forma simultània tant la presència de resposta anti-CarP com resposta ACPA, o de forma conjunta, la resposta AMPA. A més, s'ha demostrat que hi ha una correlació entre la presència d'aquestes dues famílies de forma simultània³⁷⁷ i que cadascuna d'elles, de forma independent, ha estat relacionada amb una pitjor progressió articular^{61,80,153,376}, de tal manera que detectar-les de forma conjunta podria ser útil per discriminar de forma eficient la progressió cap a un escenari de major destrucció articular.

Recentment, més enllà de la correlació amb l'afectació articular, s'ha identificat en estudis realitzats en el nostre grup de recerca¹²⁵ la presència d'una major resposta anti-CarP, especialment de l'isotip IgA, en pacients que presenten malaltia pulmonar intersticial com a patologia extra-articular.

Per tal d'estudiar el rol dels anti-CarP en relació a diferents fenotips clínic en la nostra cohort d'AR, tot i que s'han descrit a la literatura diferents assajos que empen antigens proteics com el FCS o el fibrinogen per la detecció d'aquest tipus d'anticossos^{149,378}, es va decidir treballar amb estructures peptídiques. També per aquest estudi ens vam decantar pels pèptids, ja que tal i com s'ha mencionat prèviament són estructures químiques ben definides i que ens permeten assegurar la reactivitat de cada antigen de forma consistent i reproduïble. A més, per introduir les PTMs escollides en el disseny de l'estructura primària dels pèptids no es requereix l'ús de

reaccions enzimàtiques, sinó que només s'han d'addicionar els aminoàcids modificats, que estan disponibles comercialment, durant el procés de síntesi de fase sòlida. Per tant, l'elecció d'emprar pèptids enlloc de proteïnes ens va permetre treballar amb un mètode eficient i que ens va permetre controlar en tot moment les posicions en les quals es van incloure aquestes PTMs. Un altra avantatge d'aquests, és que tal i com s'havia donat en l'estudi de preparació dels microarrays, es va sintetitzar un pèptid control amb la mateixa puresa de forma paral·lela, de tal manera que es va poder determinar que la reactivitat era específica de les PTMs en tots els casos. Es primer lloc es van sintetitzar tres variants que van rebre el nom, en anglès de *cyclic fibrin filaggrin citrullinated homocitrullinated peptide* (1,2 o 3), o de forma abreujada, CFFCHP-1, CFFCHP-2 i CFFCHP-3. Es tracta de versions del pèptid CFFCP-1 en les quals es va introduir l'homocitrul·lina en la posició 620 i/o 625 del domini [Cit⁶³⁰] α -fibrina (617-631).

Utilitzant aquests pèptids per la detecció d'anti-CarP i ACPA en la nostra població, es va observar com l'isotip predominant era la IgG, ja que estava present en un 60% dels pacients mentre que els isotips IgA i IgM, estaven presents en un percentatge menor de la població. La predominança de l'isotip IgG en els anti-CarP ha estat descrita també en la població d'AR³⁷⁹, fet que concorda amb els resultats obtinguts en aquest estudi.

Un cop definida la presència total d'AMPAs en la població d'estudi, l'anàlisi es va centrar en estudiar l'associació d'aquests autoanticossos amb diferents fenotips clínics característics de manifestacions de severitat en l'AR. Van ser considerats com a casos greus d'AR els pacients que presenten un elevat grau de destrucció articular (Larsen ≥ 18) i també els que presenten ILD. Es van fer, per tant, dos comparatives diferents: una de pacients amb grau de destrucció articular greu vs pacients amb grau de destrucció articular lleu i una altra de pacients d'AR-ILD vs AR-no-ILD. L'associació d'una major resposta AMPA amb la presència d'aquestes característiques de gravetat de la patologia es va poder confirmar amb els diferents pèptids analitzats.

Les diferències es van observar de forma més marcada en els isotips IgA i IgM, en els quals eren estadísticament significatives entre els pacients amb presentacions greus de l'AR en comparació amb els pacients sense aquestes presentacions. En l'isotip IgG, es va mostrar una lleugera tendència similar però no es va arribar a demostrar l'associació. Aquests resultats van coincidir i donen suport a alguns estudis previs on s'indicava que la presència d'ACPAs i anti-CarP estava associada tant a un dany articular major^{61,80,153,376} com a la presència de malaltia pulmonar intersticial^{125,380,381}.

En l'anàlisi de la relació AMPA-ILD, els resultats obtinguts van donar suport també a publicacions prèvies del nostre grup en les que es descrivia una major resposta anti-CarP en aquests pacients i en els quals s'indicava que l'*odds ratio* era major en l'isotip IgA¹²⁵. En aquell estudi la resposta va ser analitzada amb proteïnes carbamilades i un pèptid totalment homocitrul·linat com antígens, i aquesta vegada el resultat s'ha reproduït en el nostre estudi emprant pèptids amb dues PTMs. Les respostes AMPA determinades en el present estudi van estar especialment elevades en pacients d'ILD el cas del pèptid CFFCHP-1. En el cas dels pacients amb malaltia erosiva greu, la resposta AMPA estava elevada de forma similar en els tres pèptids emprats.

Més enllà de les PTMs estudiades en els pèptids mixtes homocitrul·linats/citrul·linats, Juarez et al¹⁵⁸ van descriure que alguns pacients d'AR presentaven també anticossos AAPA, és a dir, contra lisines acetilades, i els van trobar en pacients tant seropositius com seronegatius, indicant que podrien ser una família d'anticossos independents. Per aquesta raó, es va decidir estudiar aquesta PTM per dissenyar un pèptid final que va incloure les tres PTMs principals de forma seqüencial en la seva estructura.

Per tal d'optimitzar el disseny d'aquest pèptid, es va realitzar un estudi preliminar que ens va permetre analitzar de forma senzilla la reactivitat en front a aquestes modificacions observada en la cohort de pacients d'AR en front a les 3 PTMs. Es van dissenyar i sintetitzar fins a 10 pèptids curts basats en l'estructura del domini α -fibrina (617-631), un dels quals mantenia la base del pèptid CFFCHP-1, que havia estat escollit ja que era el que presentava majors diferències en la resposta AMPA-IgA entre AR-ILD vs AR-no ILD, i en el qual s'afegia només l'acetil lisina. També en aquest cas es va dissenyar un pèptid control.

En tres pèptids d'assaig (P2, P3 i P4) es va incloure una única PTM per pèptid mentre que en la resta de pèptids es van incloure diferents combinacions de PTMs. En la comparativa d'aquests tres primers pèptids es va observar com clarament la resposta majoritària segueix sent la resposta ACPA. Aquest petit estudi, però, ens va indicar que també existia resposta de forma independent a la presència de citrul·lina en els pacients d'AR ja que alguns dels sèrums van mostrar una alta reactivitat detectada només amb el pèptid que contenia l'homocitrul·lina i/o l'acetil lisina. A més, alguns van mostrar reactivitat en front a les dues modificacions post-traduccionals que afecten a la lisina però no van mostrar reactivitat en front del pèptid citrul·linat. Aquest resultat també es va observar, tot i que de forma tènue, en el resultat d'algun sèrum als pèptids 7 i 8, que no contenien citrul·lina però sí les altres dues PTMs.

L'estudi dels pèptids 9, 10 i 11, que contenen les 3 PTMs de forma simultània, va ser el més rellevant cara al disseny racional del nou pèptid quimèric. En ell vam poder concloure que la reactivitat observada era molt similar pels tres antígens. En base als resultats previs obtinguts amb el CFFCHP-1, es va decidir que la millor opció pel disseny del nou pèptid triplement modificat, era la d'agafar l'estructura basal del pèptid P11 com a domini de fibrina a incloure en el nou pèptid quimèric.

Això va donar lloc a la síntesi del nou pèptid, el CFFCHAP que presentava una homocitrul·lina a la posició 625 i una citrul·lina a la posició 630 i en el qual s'introduïa com a novetat una acetil lisina a la posició 620 del domini α -fibrina (617-631). Va ser sintetitzat en fase sòlida. Novament es va treballar de forma paral·lela amb un pèptid control. Un cop obtingut l'antigen, es va emprar en els immunoassajos per tal de comparar la resposta AMPA (ACPA, anti-CarP i AAPA) en la mateixa cohort de pacients d'AR. Fins on arriba el nostre coneixement i hem pogut explorar, aquesta és la primera vegada que s'ha dissenyat un pèptid en el qual s'han introduït de forma seqüencial les tres modificacions post-traduccionals més rellevants en la mateixa seqüència en el context de l'AR.

Després de realitzar els immunoassaigs per determinar la resposta AMPA amb aquest nou pèptid, es va mostrar que el rendiment del CFFCHAP era similar a l'observat en els altres tres pèptids que combinen la presència de citrul·lines i homocitrul·lines (CFFCHP-1, CFFCHP-2 i CFFCHP-3) en l'estudi general de la població d'AR. La introducció de la tercera modificació va revelar la presència d'una associació entre els nivells anti-AMPA-IgG i la presència d'ILD i de malaltia articular greu que no s'havia pogut confirmar amb els altres tres antígens.

Per una banda, l'augment dels nivells anti-AMPA-IgG en pacients d'AR-ILD de forma significativa mostra que és necessària una investigació més exhaustiva per poder comprendre el paper de l'acetil lisina en la fisiopatologia de l'AR-ILD i així contextualitzar aquesta major resposta aquí trobada.

Per altra banda, només amb el pèptid CFFCHAP es va detectar una associació també entre la positivitats anti-AMPA-IgG i la presentació de malaltia articular greu amb un major alt de destrucció. La identificació d'aquesta relació està en consonància amb un estudi recent de Studenic et al.¹⁵⁹ en que es va estudiar aquesta mateixa resposta emprant un pèptid de vimentina del qual s'han fet diferents versions per incloure les diferents modificacions post-traduccionals de forma paral·lela (no simultània) i en el qual es va concloure que existeix una major taxa de

progressió en la destrucció articular en els pacients que presenten els tres tipus d'autoanticossos. Novament, la identificació d'aquesta associació, així com la confirmació d'aquesta resposta en estudis independents indica la necessitat de dissenyar noves estructures que incloguin altres dominis rellevants en el context de l'AR.

Els resultats observats en els pèptids d'aquest estudi, que comparteixen una similitud elevada en l'estructura, mostren que la reactivitat és variable tot i presentar estructures molt similars. Aquesta observació serveix per donar èmfasi en la importància d'escollir correctament el domini de proteïna en el qual s'introdueixen les modificacions per tal d'obtenir els resultats òptims en la discriminació de l'AR. Precisament aquesta és una limitació del nostre estudi ja que l'antigen que s'ha presentat, amb diferents combinacions de PTMs, està basat en només dues proteïnes rellevants en els pacients d'AR però no representa altres proteïnes que estan presents en el teixit sinovial com l' α -enolasa o la vimentina.

Serà interessant en el futur treballar no només en l'anàlisi de l'efecte de les diferents PTMs en les estructures ja esmentades sinó en la introducció d'aquestes en fraccions derivades de dominis d'altres proteïnes per intentar abordar la necessitat que existeix d'identificar marcadors que permetin classificar els pacients que són susceptibles a desenvolupar una AR amb fenotip clínic greu. El desenvolupament d'aquests nous antigens podria donar lloc a la determinació de nous biomarcadors associats amb malalties severes com la ILD que permetrien una millora en el diagnòstic i el tractament d'aquestes complicacions en pacients d'AR. Addicionalment, cara a estudis futurs, també és interessant pensar en estudiar la resposta observada en pacients d'AR d'inici, o inclús en la fase preclínica, emprant els pèptids que presenten la combinació de les dues modificacions (homocitrul·linació i citrul·linació) en un mateix pèptid, ja que s'ha vist que la combinació de la detecció d'anti-CarP i ACPA conjuntament amb el paràmetre de positivitat del factor reumatoide dona bon resultat en la identificació d'aquest subgrup de pacients¹⁵⁵. Per confirmar la utilitat d'aquests pèptids en aquest context s'hauria de dur a terme un anàlisi en cohorts d'aquestes condicions.

Recentment s'ha descrit un nou subtipus d'anticossos denominat anti-MAA^{161,167,168}, que tenen com a diana les proteïnes modificades amb adductes de malondialdehid-acetaldehid, ha estat detectat en un elevat nombre de pacients ACPA-, fent que presenti un alt potencial com a biomarcador de l'AR i pugui esdevenir útil en el diagnòstic de la malaltia. Per aquesta raó, ens vam posar com a objectiu descriure i analitzar la presència de resposta anti-MAA en la nostra cohort de pacients i així poder estudiar si hi havia alguna correlació entre aquests anticossos i la

gravetat de l'AR o amb algun fenotip clínic dels pacients inclosos en la nostra cohort d'AR establerta, tal i com s'havia pogut establir que es donava amb la resposta anti-CarP/AAPA.

En aquesta ocasió, a diferència dels estudis que havíem dut a terme, i per tal de treballar en les mateixes condicions que les descrites en els treballs en els quals s'havia identificat inicialment aquest subtipus d'autoanticossos, es va decidir inicialment emprar proteïnes com antígens. Es va treballar, en primer lloc amb albúmina sèrica humana i posteriorment, els anàlisis es van ampliar i es va emprar també fibrinogen humà. Finalment, també es va treballar amb un antígen peptídic tal i com s'havia fet en els estudis previs ja mencionats per la detecció d'ACPA, anti-CarP i AAPA.

En els múltiples assaigs realitzats per analitzar la presència d'anticossos anti-MAA en la nostra cohort de pacients d'AR, els nostres resultats mostren que l'alta sensibilitat mostrada en els diferents estudis prèviament descrits a la literatura no és reproduïble. El valor de sensibilitat més alt obtingut en el nostre anàlisi ha estat de 19,1% en l'isotip IgG fent servir com antígen el peptídic modificat. A més, l'anàlisi en la nostra cohort només ens va permetre detectar sèrums que es considerarien positius dels isotips IgG i IgA, mentre que en el cas de l'isotip IgM es va observar que els sèrums que formen part del grup control presentaven nivells més elevats que la pròpia població d'estudi de pacients d'AR i no es va poder classificar cap sèrum d'AR com a positiu. Fent servir la proteïna de referència, l'albúmina sèrica humana, els valors de sensibilitat van ser significativament inferiors que els descrits. Es van detectar anti-MAA en el 7,3% de pacients en l'isotip IgG i del 12,9% en l'isotip IgA, valors que no es van apropar en cap cas als descrits en els dos primers estudis publicats en relació a la presència d'anti-MAA en l'AR. En aquests estudis^{161,168} es descriuen positivitats del 92% i del 80% respectivament en l'isotip IgG, del 73% i 52% respectivament en l'isotip IgG i del 38% i 18% en l'isotip IgM.

Les grans diferències obtingudes ens van fer plantejar la possibilitat de que s'estigués cometent alguna errada en la realització dels assaigs. Conseqüentment, es van repassar tots els protocols que s'havien agafat de referència per resoldre aquests dubtes. El primer dels factors que es va comprovar va ser la proteïna de referència utilitzada i el procediment realitzat per la seva modificació. Per assegurar que la verificació de la formació dels adductes s'havia dut a terme de forma exitosa, es va consultar amb els autors originals dels diferents estudis i es va poder concloure que les anàlisis s'havien dut a terme de forma adequada i que els nivells de fluorescència de la proteïna modificada amb MAA concordaven amb els esperables. A més, la preparació de l'antígen de forma repetitiva va mostrar resultats comparables entre les proteïnes

modificades en reaccions independents, de tal manera que es va assegurar que el procés de modificació de la proteïna era reproducible.

Un cop descartada la possible errada en la preparació de l'antigen HSA-MAA, es va analitzar l'assaig d'ELISA. Tampoc es va trobar en aquest punt cap diferència que pogués arribar a explicar les diferències de sensibilitat. Tots els passos s'havien donat de forma anàloga a l'assaig de referència i es va poder comprovar que els resultats obtinguts de les corbes de calibració incloses a cada assaig eren comparables a les obtingudes pels altres estudis.

Un altre punt d'anàlisi va estar l'estudi del tractament estadístic de les dades ja que en la comparació d'aquest punt en cada assaig es poden observar diferències. Per exemple, en el primer treball¹⁶¹ es considera que la positivitat de la mostra ve determinada per un punt de tall que és el resultat de la mitjana + 2,5 desviacions estàndard dels valors obtinguts en la mostra control mentre que en el segon treball¹⁶⁸ el càlcul del punt de tall es realitza amb el percentil 95 d'aquest mateix grup de mostres, valor que torna a canviar en un tercer assaig³⁸² on el càlcul es determina amb el percentil 90. Durant el procés de comprovació es van analitzar les dades determinant els punts de tall amb les diverses maneres descrites i es va poder confirmar que les diferències de sensibilitat no es podien justificar per aquest motiu ja que les diferències en els resultats van ser molt baixes. La repetició dels assaigs amb l'antigen HSA-MAA una segona vegada va donar lloc a respostes similars, que es van prendre com a confirmació de la validesa dels resultats obtinguts. Totes aquestes verificacions ens van permetre concloure, de forma raonada, que les discrepàncies en els resultats no es poden entendre com a conseqüència de cap divergència en els protocols.

També en aquesta línia, un punt a remarcar és la diferència observada entre els resultats obtinguts en el primer estudi¹⁶¹ i el segon¹⁶⁸, on les sensibilitats, tal i com s'ha exposat prèviament, mostren canvis marcats. El primer estudi mostra sensibilitats d'entre el 29 i el 93% mentre que en el segon, aquestes sensibilitats van del 17 al 83% en funció dels isotips analitzats. En la comparació individual per cada isotip es mostra com les diferències entre les sensibilitats són significativament diferents, sent més baixes en el segon estudi. En aquest cas, donat que els treballs són realitzats pel mateix grup, és d'esperar que la metodologia emprada (tal i com es descriu en els corresponents apartats de les publicacions) és la mateixa i per tant es podria descartar aquest factor com a causant de les diferències, fet que dóna suport a la hipòtesi que les diferències observades amb la nostra cohort tampoc han de respondre a diferències en la metodologia.

En les dues poblacions d'estudi existeixen diferències pel que fa a la mida (n=1720 vs n=284) i el percentatge de dones incloses (9,1% vs 37%). Aquestes divergències s'han observat també entre aquestes dues cohorts i la nostra (n=178), on són visibles sobretot en relació a algunes característiques demogràfiques. Per exemple, la nostra població està formada per una majoria de dones (78%), un valor molt proper a l'observat en diferents cohorts d'estudi de l'AR³⁸³⁻³⁸⁹ i que és representatiu de la major prevalença d'aquesta malaltia en dones que en homes. En canvi, en les cohorts emprades pels estudis del grup de la Universitat de Nebraska, aquest valor és molt diferent ja que en el seu cas les mostres provenen d'un registre de veterans de guerra i fins el 91% de mostres són d'homes en el primer dels casos i del 63% en el segon estudi. Tot i les diferències observades en les proporcions home/dona dels dos estudis, hi ha una observació que es va mostrar en el primer estudi de Thiele et al¹⁶¹ com és la presència de nivells augmentats d'anti-MAA-IgA en homes, que també s'ha pogut observar en el nostre estudi. Aquesta observació apunta a que les diferències demogràfiques no serien suficients per justificar les diferències observades en termes de sensibilitat.

No obstant, hi ha altres característiques de la mostra emprada en l'estudi original, el registre VARA, que podrien contribuir a l'alta presència d'anticossos anti-MAA reportada en aquesta població. Tal i com els mateixos autors mencionen³⁹⁰, aquesta població està conformada per veterans de guerra dels Estats Units, i en l'estudi d'algunes característiques basals mostren alts nivells de comorbiditats com la malaltia cardiovascular, aterosclerosi, diabetis mellitus o malaltia crònica pulmonar obstructiva. Algunes d'aquestes malalties s'ha relacionat també de forma directa amb la presència d'anticossos anti-MAA^{170,391,392} que podrien explicar, com a mínim parcialment, que en aquesta població se'n detecti una presència més alta que en una població on aquestes comorbiditats són menys freqüents. Els autors fan referència a que dins la població s'ha trobat una associació entre la hiperlipèmia i els nivells més alts d'anti-MAA de l'isotip IgG, fet que també es replica en aquells pacients que tenen malalties cardiovasculars.

A més, també s'han reportat altres factors que es donen especialment en aquestes poblacions com l'abús de l'alcohol³⁹³ com a conseqüència del síndrome d'estrès post-traumàtic o l'addicció a la nicotina³⁹⁴ i l'alta prevalença del tabaquisme en la població de veterans^{395,396}. El tabaquisme i el consum d'alcohol de forma combinada, tal i com es dona de forma elevada en aquesta població, podria contribuir a la formació d'adductes de MAA i lesions a nivell pulmonar³⁹⁷⁻³⁹⁹ de forma independent de la presència d'AR. En treballs realitzats pels mateixos autors, s'ha pogut establir que existeix també una relació entre la presència d'aquest tipus d'autoanticossos i la

malaltia hepàtica causada per l'alcoholisme^{171,400}. Aquests factors podrien ajudar a entendre la raó rere les diferències observades entre els estudis presentats i els resultats obtinguts en la nostra cohort.

També en aquest sentit, un últim estudi¹⁷¹ publicat recentment pel mateix grup, on la cohort d'anàlisi està basada en personal militar en actiu enlloc de veterans de guerra, presenta resultats molt més propers als obtinguts amb la nostra cohort, amb sensibilitats marcadament més baixes que les inicials, d'entre el 8 i el 22% en funció de l'isotip i amb l'IgM amb els menors valors en la cohort d'AR en comparació amb la IgG i la IgA. Aquest treball es pot prendre com una confirmació de la validesa dels nostres resultats tret que són molt més propers i és de suposar que la metodologia experimental emprada en els immunoassaigs haurà estat la mateixa que ens els assaigs previs. En vista d'aquests resultats, resulta més plausible que les característiques de les cohorts emprades i les diferències observades estiguin relacionades.

Entrant més en detall, a banda dels resultats globals de sensibilitat, que són evidentment més baixos en la nostra cohort, també hem trobat diferències en les comparacions que es presenten en els estudis originals. En aquests es mostra com els pacients CCP (+) presenten nivells més alts d'anti-MAA pels tres isotips que els CCP (-) i que el grup control, un fet que no s'ha reproduït en la nostra cohort. D'aquesta comparació resulta destacable, que tot i que presenten nivells menors, els pacients seronegatius presenten nivells més elevats que la població control. En el primer dels treballs¹⁶¹ es detecten aquests anticossos entre el 29 i el 88% dels pacients en funció de l'isotip analitzat mentre que en el segon¹⁶⁸ la positivitat disminueix una mica però segueix sent considerable, amb valors que es mouen entre el 17 i el 66%. Sembla un descobriment esperançador cara a l'ús d'aquests anticossos com a potencials biomarcadors en aquest subgrup, que fins al moment no ha mostrat un component humoral clar i detectable que en pugui facilitar el diagnòstic de forma sensible i específica.

Respecte al seu ús com a biomarcadors, no podem establir-ne l'especificitat respecte altres malalties ja que no s'ha inclòs pacients d'altres patologies per la seva comparació i per tant només podem comparar la sensibilitat obtinguda en la nostra cohort i establir-ne la comparació amb la població sana. En relació a la sensibilitat queda clar que la resposta observada és molt baixa en el subgrup CCP (-), i només es detecta una resposta major en comparació amb el grup control quan es fa servir l'antigen peptídic, fet que no s'ha reproduït amb l'HSA-MAA, amb el qual s'esperaria poder trobar una resposta similar a la presentada al treball original ja que és el mateix antigen. De fet, i com ja s'ha esmentat anteriorment, amb la proteïna HSA-MAA no només hem obtingut

resultats molt més baixos de sensibilitat amb els isotips IgA i IgG, sinó que en l'isotip IgM hem observat un menor nivell d'anticossos en els dos subgrups d'AR que en la població control.

En el segon treball¹⁶⁸ s'analitza la presència d'anticossos anti-MAA en pacients d'AR i en pacients de diferents malalties reumàtiques com l'artrosi o la espondiloartropatia, que poden presentar similituds fenotípiques amb l'AR i també amb el lupus eritematós sistèmic, el prototip de malaltia autoimmunitària sistèmica amb presència de diferents autoanticossos. Els propis resultats i conclusions exposats per Mikuls et al¹⁶⁸ mostren que els anticossos anti-MAA, presenten una alta sensibilitat en la mostra d'AR però no han estat capaços de discriminar de forma específica entre l'AR i les altres malalties.

En els resultats es mostra que tot i que els nivells més alts d'anti-MAA dels isotips IgA i IgM es troben de forma estadísticament significativa en els pacients d'AR, aquests també es detecten en pacients de les altres malalties ja esmentades. A més, destaquen també que en el cas de l'isotip IgG els valors més alts es van observar en pacients de Lupus tot i que sense presentar diferències amb els d'AR. Per tant, ells mateixos conclouen que la presència d'aquests autoanticossos en diferents malalties inflamatòries reumàtiques no els ha permès discriminar els pacients d'AR de forma suficientment específica amb aquest biomarcador.

Per altra banda, en un estudi recent¹⁶⁷ es va poder establir una associació entre els nivells més alts d'anti-MAA i la presentació d'una manifestació extra-articular tant rellevant com la malaltia pulmonar intersticial. Donada la mortalitat prematura associada així com l'empitjorament de la qualitat de vida en els pacients d'AR-ILD, s'estan duent a terme diferents estudis que han permès trobar biomarcadors que estan associats a la seva presència, com els anticossos anti-CarP, els quals s'ha demostrat que es troben en nivells més elevats en aquesta subpoblació dins dels pacients d'AR¹²⁵. La confirmació de la relació anti-MAA/AR-ILD seria rellevant tant com a criteri diagnòstic a tenir en compte per poder ajudar a la correcta classificació dels pacients amb AR-ILD com per poder generar coneixement sobre quins esdeveniments poden estar succeint en aquests pacients a nivell molecular per donar lloc a aquest tipus d'adductes que estarien relacionats amb l'ILD.

En l'estudi¹⁶⁷ es va mostrar com els pacients amb ILD presentaven majors nivells tant d'anti-MAA IgA com IgM, fet que tampoc vam poder reproduir amb la nostra cohort. En aquest cas, també existeixen diferents factors que poden contribuir a la presència d'aquestes diferències. Existeixen diferències de la prevalença d'ILD en les dues cohorts (4,7% en la cohort presentada per England

et al¹⁶⁷ i 20,7% en la cohort de l'Hospital Clínic) així com les diferències demogràfiques ja observades en les comparacions prèvies com la predominança masculina en la seva cohort en comparació a la predominança femenina en la nostra. La nul·la associació detectada en la nostra cohort també podria ser conseqüència de la baixa sensibilitat observada de forma general. És a dir, com en la nostra cohort els nivells d'anticossos detectats han estat baixos i la sensibilitat general és baixa, és difícil poder observar diferències rellevants entre els grups ja que tots mostren respostes generalment baixes i similars.

Degut als pobres resultats obtinguts emprant com a antigen l'albumina sèrica humana, que el mateix grup de la Universitat de Nebraska reconeix que podria ser un factor limitant degut a que no és una proteïna relacionada amb l'AR, vam decidir explorar l'ús de nous antigens. Per aquest motiu vam diversificar en dos camins – en primer lloc vam seguir aprofundint en el camí dels antigens proteïcs modificant el fibrinogen com a conseqüència de la utilitat observada d'aquesta proteïna com antigen en altres estudis relacionats amb l'AR i altres PTMs. En segon lloc, es va decidir emprar un pèptid sintètic (CFFCMaP) pels avantatges que presenta en termes de reproduïbilitat dels assaigs i la facilitat de la seva caracterització completa. En aquest cas, per tal de fer un ús racional del sèrum disponible de la nostra col·lecció degut al seu alt valor mèdic, es va decidir en primer lloc només fer l'anàlisi en un dels isotips d'estudi. Es va escollir l'isotip IgG ja que és en aquest on s'havia observat nivells més alts d'anticossos en els estudis previs, a part de ser de forma generalitzada l'isotip més abundant en el sèrum humà⁴⁰¹.

Amb aquests nous estudis es va poder observar un augment clar de la sensibilitat en l'isotip IgG amb els dos antigens (fibrinogen-MAA i el pèptid CFFCMaP), que van presentar valors similars, del 18 i 19% respectivament. En el cas del fibrinogen es va dur a terme exactament el mateix protocol d'assaig que per l'albumina sèrica humana, de tal manera que l'augment de la sensibilitat no estaria relacionat amb la metodologia sinó que seria atribuïble a la diferència d'antigen. En el cas del pèptid, el protocol emprat per l'immunoassaig va diferir donat que per unir el pèptid a la placa el procediment és diferent. El protocol en aquest cas va ser el mateix que en altres múltiples pèptids que s'han analitzat com a antigens, inclosos els assajos que han permès la detecció d'ACPA, anti-CarP i AAPA i que han permès la identificació de la relació entre la major presència d'AMPAs i AR greu, i que es basen en l'ús de pèptids biotinitats.

Emprant com antigen el fibrinogen-MAA sí que es va poder establir la presència de majors nivells d'anticossos en el subgrup CCP (+) respecte el grup control, però les diferències no van ser significatives en la comparació amb els pacients seronegatius. Tampoc es va poder observar

diferència entre el grup seronegatiu i el grup control. En canvi, emprant l'ús del pèptid CFFCMap es va poder observar una diferència entre el grup CCP (+) i els controls que es va replicar entre el grup seronegatiu i els controls. Tampoc en aquesta ocasió es van observar diferències entre els dos subgrups d'AR. Així doncs, amb aquests antígens es va observar una relació entre les dues famílies d'anticossos, els ACPA i anti-MAA que s'havia descrit en els treballs anteriors^{161,168}. La millora dels resultats obtinguts amb aquests assaigs confirma que el refinament dels mètodes per la detecció d'aquests anticossos pot suposar un enriquiment del coneixement al respecte de les implicacions que presenten aquests en els processos inflamatoris de l'AR.

Amb els resultats obtinguts en la nostra cohort sembla clar que no s'ha pogut confirmar la importància d'aquests anticossos en l'AR. Els resultats obtinguts emprant la mateixa proteïna donen diferències molt significatives pel que fa a la sensibilitat obtinguda respecte els estudis previs. Tot i que podrien tenir una explicació parcial en les diferències clares entre les característiques de les cohorts d'estudi, no s'ha pogut confirmar quina és la causa entre la divergència dels resultats. La confirmació de la presència d'aquests anticossos anti-MAA en malalties molt diverses – des d'AR fins a colitis ulcerosa^{161,170–172,391} – posen de manifest que no són exclusius d'una patologia sinó que més aviat són una conseqüència de diferents processos inflamatoris que es donen com a conseqüència de l'estrès oxidatiu, que dona lloc a processos com la peroxidació lipídica de les membranes. Aquesta hipòtesi està suportada pel fet que aquest processos donen lloc al malondialdehid, i de forma espontània a l'acetaldehid, necessària per la formació d'aquests adductes³⁵⁰. Tot i que no es doni de manera específica en l'AR no es pot descartar que tingui una implicació en la seva fisiopatologia i/o que contribueixi a la seva aparició o perpetuació. En aquest cas, els anticossos de la família anti-MAA es podrien utilitzar de forma complementària pel diagnòstic però amb els resultats obtinguts es mostra que no són un sistema d'autoanticossos rellevant en l'AR comparable als ACPA o anti-CarP donat que no mostren especificitat o sensibilitat que els recolzi com a sistema d'autoanticossos independent d'aquesta patologia. Aquests resultats obren la porta a fer nous estudis per comprendre el paper d'aquest tipus d'anticossos en l'AR però no poden donar suport al seu ús com a biomarcador discriminatiu per ser emprat en el diagnòstic de forma diferencial.

Amb aquests resultats sembla clar que la resposta que es pot relacionar amb la presència d'AR és la del tipus ACPA, anti-CarP i AAPA. La resposta ACPA, però, no es troba exclusivament en els pacients d'AR sinó que s'ha observat també en pacients de patologies reumàtiques com el reumatisme palindròmic. En un estudi previ¹⁹¹ realitzat pel nostre grup en el que es va estudiar la resposta ACPA en pacients de RP de llarga durada i AR establerta es va poder concloure que

ambdós grups presenten aquesta resposta però en el cas dels pacients de RP aquesta és detectable de manera més restringida pel que fa als tipus d'isotips detectats i els nivells de positivitat i valors mitjans d'anticossos presentats^{192,402}. En base a aquests resultats, i donat que s'havia pogut dissenyar i sintetitzar exitosament nous antígens peptídics que permetien l'estudi de la resposta ACPA, anti-CarP i AAPA, es va decidir estudiar la resposta AMPA en un grup de pacients de RP de recent diagnòstic i comparar els resultats amb els obtinguts en la població d'AR establerta.

Per dur a terme les diferents anàlisis es va treballar en aquest cas amb antígens proteics i peptídics prèviament validats en diversos estudis per la detecció d'anticossos en el context d'AR. Es va treballar en la determinació d'anti-CarP amb l'ús del FCS-CarP ja que es tracta d'un dels antígens més emprats per la detecció d'aquest tipus d'autoanticossos, tal i com queda demostrat en múltiples estudis en el que ha estat escollit amb aquest objectiu^{80,377,403-405}. Addicionalment, també es va treballar amb el fibrinogen, en aquest cas d'origen humà, en la seva forma carbamilada. El Fib-CarP és un altre antigen també àmpliament descrit en aquest context^{378,406-408}. La caracterització de les proteïnes tant carbamilades com control va ser essencial per poder obtenir uns resultats reproduïbles entre les diferents plaques i assegurar una homogeneïtat a nivell del grau de modificació de les proteïnes presentades. Per assegurar que els resultats obtinguts en cada anàlisi complien els requisits de reproduïbilitat per ser validats, es va comprovar la variabilitat entre plaques mitjançant l'ús de les rectes de calibratge i de controls inclosos en el disseny. Tots aquests paràmetres són essencials per assegurar el bon funcionament dels assaigs de determinació d'anticossos emprant antígens proteics, que com s'ha comentat prèviament, presenten una major complexitat pel que fa a la seva reproduïbilitat¹³⁸.

També en aquest cas els estudis van incorporar novament una estructura peptídica derivada del pèptid cíclic quimèric de fibrina i filagrina, CFFCP-1, que va servir de base per la incorporació de diverses homocitrul·lines en la seva seqüència i que havia estat prèviament emprat per l'estudi de la reactivitat amb altres modificacions post-traduccionals, com la citrul·lina^{142,261}. L'estudi de la resposta anti-CarP amb aquest pèptid quimèric va requerir menys volum de sèrum que els anàlisis amb els antígens proteics, i la caracterització de la molècula va ser senzilla. Els assajos es van dur a terme també amb els pèptids prèviament emprats per la determinació de la resposta AMPA en la població d'AR establerta (CFFCHP-1, CFFCHP-2, CFFCHP-3 i CFFCHAP). Aquests pèptids havien estat prèviament descrits, emprats i validats com antígens per la detecció d'AMPAs en estudis previs amb una cohort de pacients d'AR i una cohort control formada per mostres rebudes del banc de sang²³⁸.

La comparació de les característiques demogràfiques de les dues cohorts ha mostrat que no hi ha diferències significatives pel que fa al % de dones representatiu de cada cohort (75,6% vs 77,6%) ni tampoc pel que fa a l'edat. L'anàlisi de la presència d'anticossos emprats en el diagnòstic de l'AR, com són el FR i els ACPA mesurats amb el test CCP2 van confirmar que aquesta resposta és comparable entre els membres de les dues cohorts d'anàlisi escollides. En canvi, l'anàlisi de la resposta AMPA, analitzada emprant els pèptids amb múltiples PTMs, va mostrar clares diferències entre les dues cohorts. La resposta observada en el grup de RP va ser més baixa i restringida pel que fa a la presència de diferents isotips que l'observada en el grup d'AR. Com a tret en comú, es va observar que la resposta majoritària en les dues cohorts és la de l'isotip IgG. La resposta anti-AMPA-IgG és la més àmplia en tots dos grups, amb percentatges que oscil·len entre el 65 i el 70% en els casos d'AR i entre el 55 i el 60% en els casos de RP. No es va observar diferències significatives entre els dos grups comparats.

Es va observar una presència marcadament inferior d'anti-AMPA-IgA i anti-AMPA-IgM, respecte l'anti-AMPA-IgG. En el cas de l'isotip IgA es van observar valors de positivitat màxims del 45% en els pacients d'AR i del 27% en el cas dels pacients de RP. A més, es van observar diferències estadísticament significatives entre la resposta anti-CFFCHP-2-IgA i anti-CFFCHP-3-IgA dels pacients de RP i els d'AR. En el cas de l'isotip IgM, la resposta anti-AMPA va ser en general més baixa que en els altres dos isotips, ja que només es van detectar entre el 15 i 30% dels pacients en funció de l'antigen/grup d'anàlisi estudiat. En l'isotip IgM tampoc es van trobar diferències entre el grup de RP i AR.

Si ens centrem exclusivament en la resposta anti-CarP, detectada tant per els antígens proteics carbamilatats com pel pèptid totalment homocitrul·linat, les diferències observades entre els dos grups van ser encara més evidents. L'isotip IgG va seguir sent el predominant en les dues poblacions també en aquest subgrup d'anticossos, però tant el percentatge de positivitat com els nivells d'anti-CarP detectats amb els tres antígens testats són diferents en els dos grups. Mentre la positivitat es troba al voltant del 50% en la població d'AR, en la població de RP és significativament més baixa i la presència d'anti-CarP-IgG només es pot detectar en aproximadament el 25% de la població. Els nivells resposta positiva de l'isotip IgA són marcadament més baixos que els de IgG en les dues poblacions, ja que la positivitat està al voltant del 20% en la població d'AR i del 15% en els pacients de RP. La resposta anti-CarP-IgA, va ser més alta en pacients d'AR que en els de RP, tal i com es va mostrar en els resultats obtinguts tant amb

el FCS-CarP com en el pèptid CFFHP. Aquestes diferències es van detectar tant pel que fa a la freqüència de la resposta com als nivells d'anti-CarP-IgA.

Aquest fet es va replicar en l'isotip IgM, l'isotip en el qual es van detectar menys casos per les dues poblacions, aproximadament un 15% de casos en els pacients d'AR i 10% en els pacients de RP. En aquest isotip es van observar diferències significatives en els nivells observats però no en la freqüència de presentació d'aquests anticossos. Es va observar clarament la mateixa tendència, tot i que no es va arribar a assolir una significació estadística.

Així doncs, la conclusió global de l'estudi amb diferents especificitats que permeten la detecció d'AMPAs i l'ús d'altres que permeten només la detecció d'anti-CarP és clara. La resposta general observada en el grup de RP està més restringida de forma global, tant pel que fa a la positivitats als diferents antigens/isotips com pel que fa als nivells detectats, que són més baixos. Aquests resultats concorden amb els estudis previs realitzats en el nostre grup, en que la distribució observada tant d'anti-CarP com d'ACPA i les diferències observades entre els dos grups, va ser similar a l'observada en aquest estudi amb pacients de RP de recent diagnòstic^{191,192,402}.

Aquest perfil característic dels pacients de RP, amb un patró de reconeixement més restringit s'ha descrit també en algunes fases preclíniques d'AR, en els quals ja hi ha presència tant d'anti-CarP com d'ACPA^{335,377}. En aquests estadis també hi ha una predominança de l'isotip IgG, que apareix abans que els isotips IgA i IgM⁴⁰⁹. En el cas de l'AR s'ha vist com amb els anys, a mesura que el pacient s'apropa a la manifestació clínica de la malaltia, es comença a mostrar una resposta més àmplia de reconeixement d'epítops diversos i d'expansió dels isotips emprats.

Aquesta expansió no es va observar en els pacients de RP establerta (és a dir, de llarga durada) inclosos en l'estudi de Castellanos-Moreira et al¹⁹¹ sinó que es va observar un patró restringit de resposta anti-CarP. Els resultats obtinguts en aquesta anàlisi mostren una tendència molt similar a l'observada en l'estudi amb pacients de RP establert, fet que podria indicar que l'absència d'una resposta AMPA d'IgA, i especialment anti-CarP en tots els seus isotips podria estar associada a una menor taxa de progressió cap a AR en un subgrup de pacients amb RP.

A nivell global, en tots els resultats obtinguts durant el transcurs de la realització dels diversos estudis inclosos en aquesta tesi doctoral s'ha pogut comprovar l'àmplia utilitat que tenen els pèptids sintètics, i tot i que s'han emprat en menor mesura, les proteïnes per tal de generar antígens que ens permetin la detecció d'anticossos que tenen com a diana diferents PTMs en el context de l'AR. S'han tret conclusions interessants respecte l'ús de nous antígens que han permès comprovar la rellevància de la resposta anti-AMPA (ACPA, anti-CarP i AAPA) en l'AR i relacionar aquesta resposta amb diferents fenotips clínics. L'estudi futur de noves estructures que incloguin altres proteïnes diverses i/o combinacions de PTMs ajudarà, de ben segur, a millorar el potencial dels antígens peptídics en l'AR i altres malalties immunomediades. També serà interessant seguir el camí començat amb el desenvolupament del microarray peptídic incloent noves estructures peptídiques amb diferents PTMs per poder discernir si l'ús d'aquest tipus de suport ens pot ser de utilitat per estratificar els pacients d'acord amb diferents fenotips clínics i de veure si, amb la inclusió de nous antígens diversos, se'n pot millorar el rendiment diagnòstic de forma global.

Conclusions

A continuació s'exposen les conclusions extretes dels diferents estudis realitzats com a part d'aquesta tesi.

- S'ha desenvolupat una plataforma multiplex en la qual s'han inclòs 8 pèptids quimèrics citrul·linats que consten de dominis de diferents proteïnes humanes amb rellevància en el teixit sinovial dels pacients d'AR.
- S'ha determinat que el sistema de diagnòstic miniaturitzat presenta un bon balanç sensibilitat/especificitat en l'anàlisi de mostres de sèrum de pacients d'AR, d'individus sans i de pacients de PsA. S'han assolit valors del 100% d'especificitat quan el punt de tall de positivitat es basa en la presència de 3 o més pèptids positius de forma simultània. El test ha servit per detectar de forma específica la resposta ACPA en els pacients d'AR.
- S'han dissenyat i sintetitzat diferents antígens peptídics que presenten diferents PTMs a la seva estructura primària, els quals han permès la detecció d'AMPAs amb una elevada especificitat i una acceptable sensibilitat.
- S'ha trobat una associació entre la presència i els nivells alts d'AMPAs i la presentació de fenotips més severos d'AR com són el major grau de destrucció articular i la manifestació de patologies extra-articulars com és l'ILD. Per aquesta determinació ha estat especialment rellevant l'ús del pèptid CFFCHAP, que presenta les tres PTMs (citrul·linació, homocitrul·linació i lisina acetilada).
- L'obtenció d'antígens proteics que presenten adductes de MAA i la síntesi d'un pèptid modificat d'igual forma s'ha donat de forma exitosa i ha permès l'estudi de la resposta anti-MAA.
- Els anticossos anti-MAA han estat detectats en menys d'un 20% de la població d'AR testada, independentment del tipus d'antigen emprat. L'ús d'antígens amb més rellevància en l'AR, com són el fibrinògen i el pèptid quimèric de fibrina/filagrina, ha permès augmentar la sensibilitat de l'assaig, tot i no arribar a mostrar resultats adients per la consideració dels anti-MAA com a biomarcadors discriminatius d'AR.

- La resposta immunitària AMPA detectada emprant els diferents pèptids i proteïnes com antígens és clarament diferent entre els pacients de PR i els pacients d'AR. En el cas dels pacients de PR, aquesta és inferior i està més restringida, tant en el nombre d'epítops reconeguts com en la presència dels diferents isotips analitzats (IgG, IgA i IgM).
- L'absència d'isotips AMPA-IgA, i especialment d'anti-CarP, en els pacients de PR podria estar associat a una menor risc de progressió cap a AR.

Bibliografia

- 1 van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2020; **110**: 102392.
- 2 Firestein GS. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; **16**: 1–3.
- 3 Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS *et al*. Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1 2018; **4**: 1–23.
- 4 Gulati M, Farah Z, Mouyis M. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Medicine* 2018; **46**: 211–215.
- 5 Díaz Cuña C, Consani S, Rostan S, Fernández L, Moreira E, Sanmartí R. Rheumatoid arthritis: Extra articular manifestations and comorbidities. *Revista Colombiana de Reumatología* 2022; **29**: 196–204.
- 6 Cardiel MH. Treat to Target Strategy in Rheumatoid Arthritis: Real Benefits. *Reumatología Clínica (English Edition)* 2013; **9**: 101–105.
- 7 Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G *et al*. Treating rheumatoid arthritis to target: Recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**: 631–637.
- 8 van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: 1–10.
- 9 de Stefano L, D’Onofrio B, Manzo A, Montecucco C, Bugatti S. The Genetic, Environmental, and Immunopathological Complexity of Autoantibody-Negative Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 12386 2021; **22**: 12386.
- 10 Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010; **35**: 10–14.
- 11 Alamanos Y, Voulgari P v., 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**: 182–188.
- 12 Malemba JJ, Mbuyi-Muamba JM, Mukaya J, Bossuyt X, Verschueren P, Westhovens R. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Kinshasa, Democratic Republic of Congo-A population-based study. *Rheumatology* 2012; **51**: 1644–1647.
- 13 Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: A review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2005; **34**: 662–667.
- 14 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 & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2000; **43**: 30–37.
- 15 Feldman MW, Lewontin RC. The heritability hang-up. *Science (1979)* 1975; **190**: 1163–1168.
- 16 van der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes REM, Huizinga TWJ, Thomson W, Worthington J *et al*. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 916–923.
- 17 Frisell T, Holmqvist M, Källberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: Role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum* 2013; **65**: 2773–2782.
- 18 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* 2013 506:7488 2013; **506**: 376–381.
- 19 Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis* 2019; **78**: 446–453.
- 20 Weyand CM, Goronzy JJ. Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; **2**: 212–216.
- 21 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The Shared Epitope Hypothesis. *Arthritis Rheum* 1987; **30**: 1205–1212.
- 22 Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X *et al*. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012; **44**: 291–296.
- 23 McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1977; **20**: 1037–1042.
- 24 Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 1978; **298**: 869–871.
- 25 Legrand L, Lathrop GM, Marcelli-Barge A, Dryll A, Bardin T, Debeyre N *et al*. HLA-DR genotype risks in seropositive rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1984; **36**: 690.

- 26 Kampstra ASB, Toes REM. HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation. *Immunogenetics* 2017; **69**: 597–603.
- 27 van der Helm-Van Mil AHM, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, de Vries RRP, Toes REM. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 2637–2644.
- 28 Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; **42**: 508–514.
- 29 Cruz-Tapias P, Pérez-Fernández OM, Rojas-Villarraga A, Rodríguez-Rodríguez A, Arango MT, Anaya JM. Shared HLA class II in six autoimmune diseases in Latin America: A meta-analysis. *Autoimmune Dis* 2012; **569728**.
- 30 Terao C, Yano K, Ikari K, Furu M, Yamakawa N, Yoshida S *et al.* Brief report: Main contribution of DRB1*04:05 among the shared epitope alleles and involvement of DRB1 amino acid position 57 in association with joint destruction in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2015; **67**: 1744–1750.
- 31 Scally SW, Law SC, Ting YT, Heemst J van, Sokolove J, Deutsch AJ *et al.* Molecular basis for increased susceptibility of Indigenous North Americans to seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017; **76**: 1915–1923.
- 32 Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 2011; **585**: 3689–3698.
- 33 Yu X, Sun JP, He Y, Guo X, Liu S, Zhou B *et al.* Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 19767–19772.
- 34 Ruiz-Esquivé V, Sanmartí R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin* 2012; **8**: 342–350.
- 35 Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* 1987; **35**: 457–464.
- 36 Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *Ann Rheum Dis* 2001; **60**: 223–227.
- 37 Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L *et al.* Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: Results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**: 835–841.
- 38 Karlson EW, Lee I, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1999; **42**: 910–917.
- 39 Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women. *American Journal of Medicine* 2006; **119**.
- 40 Padyukov L, Suva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 3085–3092.
- 41 Stolt P, Källberg H, Lundberg I, Sjögren B, Klareskog L, Alfredsson L. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: Results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**: 582–586.
- 42 Catrina AI, Deane KD, Scher JU. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2016; **55**: 391–402.
- 43 Bergot AS, Giri R, Thomas R. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2019; **33**: 101497.
- 44 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**: 542–557.
- 45 Möller B, Kollert F, Sculean A, Villiger PM. Infectious Triggers in Periodontitis and the Gut in Rheumatoid Arthritis (RA): A Complex Story About Association and Causality. *Front Immunol* 2020; **11**.
- 46 Gómez-Bañuelos E, Mukherjee A, Darrah E, Andrade F. Rheumatoid Arthritis-Associated Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Med* 2019; **8**: 1309.

- 47 Eriksson K, Fei G, Lundmark A, Benchimol D, Lee L, Hu YOO *et al.* Periodontal health and oral microbiota in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Med* 2019; **8**.
- 48 Renvert S, Berglund JS, Persson GR, Söderlin MK. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease in a population-based cross-sectional case-control study. *BMC Rheumatol* 2020; **4**.
- 49 Ortona E, Pierdominici M, Maseli A, Veroni C, Aloisi F, Shoenfeld Y. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanita* 2016; **52**: 205–212.
- 50 Favalli EG, Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Raimondo MG, Meroni PL. Sex and Management of Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019; **56**: 333–345.
- 51 Alpízar-Rodríguez 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**: 1254–1263.
- 52 Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LGM, 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**: 638–641.
- 53 Raza K, Holers VM, Gerlag D. Nomenclature for the Phases of the Development of Rheumatoid Arthritis. *Clin Ther* 2019; **41**: 1279–1285.
- 54 van Steenberg HW, Aletaha D, Beart-Van De Voorde LJJ, Brouwer E, Codreanu C, Combe B *et al.* EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017; **76**: 491–496.
- 55 van Steenberg HW, van Nies JAB, Huizinga TWJ, Bloem JL, Reijnerse M, van der Helm-Van Mil AHM *et al.* Characterising arthralgia in the preclinical phase of rheumatoid arthritis using MRI. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 1225–1232.
- 56 Volkov M, van Schie KA, van der Woude D. Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol Rev* 2020; **294**: 148–163.
- 57 Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**: 60–75.
- 58 Perry E, Kelly C, Eggleton P, de Soyza A, Hutchinson D. The lung in ACPA-positive rheumatoid arthritis: an initiating site of injury? *Rheumatology* 2014; **53**: 1940–1950.
- 59 Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJW, 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**: 1488–1492.
- 60 de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Advances in Rheumatology* 2019; **59**: 2.
- 61 Willemze A, Trouw LA, Toes REM, Huizinga TWJ. The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. *Nat Rev Rheumatol* 2012; **8**: 144–152.
- 62 Zaiss MM, Joyce Wu HJ, Mauro D, Schett G, Ciccía F. The gut-joint axis in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2021; **17**: 224–237.
- 63 van der Woude D, Rantapää-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, Onnekink C, Schwarte CM, Verpoort KN *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**: 1554–1561.
- 64 Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M *et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor α through Fc γ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 678–688.
- 65 Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE *et al.* Autoantibody Epitope Spreading in the Pre-Clinical Phase Predicts Progression to Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2012; **7**: e35296.
- 66 Reynisdóttir G, Karimi R, Joshua V, Olsen H, Hensvold AH, Harju A *et al.* Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2014; **66**: 31–39.
- 67 Farrugia M, Baron B. The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. *J Clin Transl Res* 2016; **2**: 84.
- 68 Krishnamurthy A, Joshua V, Hensvold AH, Jin T, Sun M, Vivar N *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying Rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis* 2016; **75**: 721–729.

- 69 Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: Analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther* 2014; **16**.
- 70 Willis VC, Demoruelle MK, Derber LA, Chartier-Logan CJ, Parish MC, Pedraza IF *et al*. Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. *Arthritis Rheum* 2013; **65**: 2545–2554.
- 71 Chen W, Wang Q, Ke Y, Lin J. Neutrophil function in an inflammatory milieu of rheumatoid arthritis. *J Immunol Res* 2018; **2018**.
- 72 Rivellese F, Nerviani A, Rossi FW, Marone G, Matucci-Cerinic M, de Paulis A *et al*. Mast cells in rheumatoid arthritis: friends or foes? *Autoimmun Rev* 2017; **16**: 557–563.
- 73 Kinslow JD, Blum LK, Deane KD, Demoruelle MK, Okamoto Y, Parish MC *et al*. Elevated IgA Plasmablast Levels in Subjects at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2016; **68**: 2372–2383.
- 74 Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K *et al*. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 2000 **408**:6812 2000; **408**: 600–605.
- 75 Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2007; **370**: 1861–1874.
- 76 L Pablos J, Canete JD. Immunopathology of rheumatoid arthritis. *Curr Top Med Chem* 2013; **13**: 705–711.
- 77 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**: 1772–1777.
- 78 Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2017; **2017**.
- 79 Reed E, Hedström AK, Hansson M, Mathsson-Alm L, Brynedal B, Saevarsdottir S *et al*. Presence of autoantibodies in ‘seronegative’ rheumatoid arthritis associates with classical risk factors and high disease activity. *Arthritis Res Ther* 2020; **22**: 1–11.
- 80 Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, 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**: 17372–17377.
- 81 van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EWN, Toes REM, Huizinga TWJ, van Laar JM. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 53–60.
- 82 Pratt AG, Isaacs JD. Seronegative rheumatoid arthritis: Pathogenetic and therapeutic aspects. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014; **28**: 651–659.
- 83 Gómez-Puerta JA, Celis R, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Ramírez J, Haro I *et al*. Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated peptide/protein antibody-positive and –negative rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013; **15**: R182.
- 84 Scott DL, Pugner K, Kaarela K, Doyle D v., Woolf A, Holmes J *et al*. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000; **39**: 122–132.
- 85 Monti S, Montecucco C, Bugatti S, Caporali R. Rheumatoid arthritis treatment: the earlier the better to prevent joint damage. *RMD Open* 2015; **1**: e000057.
- 86 Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiologica - Series Diagnosis* 1977; **18**: 481–491.
- 87 Larsen A. How to apply the Larsen score in evaluating radiographs of rheumatoid arthritis in longterm studies. *J Rheumatol* 1995; **22**: 1974–1975.
- 88 Sharp JT, Lidsky MD, Collins LC, Moreland J. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. Correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum* 1971; **14**: 706–720.
- 89 Pincus T, Callahan LF, Fuchs HA, Larsen A, Kaye J. Quantitative analysis of hand radiographs in rheumatoid arthritis: time course of radiographic changes, relation to joint examination measures, and comparison of different scoring methods. *J Rheumatol* 1995; **22**: 1983–1989.
- 90 van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol* 2000; **27**: 261–263.

- 91 Ory PA. Interpreting radiographic data in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**: 597–604.
- 92 Radner H, Yoshida K, Smolen JS, Solomon DH. Multimorbidity and rheumatic conditions—enhancing the concept of comorbidity. *Nature Reviews Rheumatology* 2014 10:4 2014; **10**: 252–256.
- 93 Dey M, Nagy G, Nikiphorou E. Comorbidities or extra-articular manifestations - time to reconsider the terminology? *Rheumatology* 2022; **61**: 3881–3883.
- 94 Norton S, Koduri G, Nikiphorou E, Dixey J, Williams P, Young A. A study of baseline prevalence and cumulative incidence of comorbidity and extra-articular manifestations in RA and their impact on outcome. *Rheumatology (Oxford)* 2013; **52**: 99–110.
- 95 Marcucci E, Bartoloni E, Alunno A, Leone MC, Cafaro G, Luccioli F *et al.* Extra-articular rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2018; **70**: 212–224.
- 96 Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: an update. *Autoimmun Rev* 2011; **11**: 123–131.
- 97 Gonzalez-Lopez L, Rocha-Muñoz AD, Ponce-Guarneros M, Flores-Chavez A, Salazar-Paramo M, Nava A *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) relation with extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res* 2014; **2014**.
- 98 Turesson C, Jacobsson L, Bergström U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38**: 668–674.
- 99 Erhardt CC, Mumford PA, Venables PJW, Maini RN. Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1989; **48**: 7–13.
- 100 Watts RA, Carruthers DM, Symmons DPM, Scott DGI. The incidence of rheumatoid vasculitis in the Norwich Health Authority. *Br J Rheumatol* 1994; **33**: 832–833.
- 101 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**: 1583–1591.
- 102 Geirsson AJ, Sturfelt G, Truedsson L. Clinical and serological features of severe vasculitis in rheumatoid arthritis: Prognostic implications. *Ann Rheum Dis* 1987; **46**: 727–733.
- 103 Turesson C, Jacobsson L, Bergström U, Truedsson L, Sturfelt G. Predictors of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2000; **29**: 358–364.
- 104 Weyand CM, Xie C, Goronzy JJ. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1992; **89**: 2033–2039.
- 105 Turesson C, Weyand CM, Matteson EL. Genetics of rheumatoid arthritis: Is there a pattern predicting extraarticular manifestations? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2004; **51**: 853–863.
- 106 Riise T, Jacobsen BK, Gran JT, Haga HJ, Arnesen E. Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17-year prospective study. *Clin Rheumatol* 2001; **20**: 123–127.
- 107 Kvalvik AG, Jones MA, Symmons DPM. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand J Rheumatol* 2000; **29**: 29–37.
- 108 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* 2007; **46**: 350–357.
- 109 Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007; **21**: 907–927.
- 110 Spagnolo P, Lee JS, Sverzellati N, Rossi G, Cottin V. The Lung in Rheumatoid Arthritis: Focus on Interstitial Lung Disease. *Arthritis & Rheumatology* 2018; **70**: 1544–1554.
- 111 Antoine M, Mlika M. Interstitial Lung Disease. *Pneumologie* 2021; **18**: 129–137.
- 112 O'Dwyer DN, Armstrong ME, Cooke G, Dodd JD, Veale DJ, Donnelly SC. Rheumatoid Arthritis (RA) associated interstitial lung disease (ILD). *Eur J Intern Med* 2013; **24**: 597–603.
- 113 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**: 372–378.
- 114 Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, Webb WR, Ryu JH, van Uden JH *et al.* Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *European Respiratory Journal* 2010; **35**: 1322–1328.
- 115 Ascherman DP. Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2010; **12**: 363–369.

- 116 Cavagna L, Monti S, Grosso V, Boffini N, Scorletti E, Crepaldi G *et al.* The multifaceted aspects of
interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int* 2013; **2013**.
- 117 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**: 528–535.
- 118 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**: 159–166.
- 119 Carmona L, González-Álvaro I, Balsa A, Belmonte MA, Tena X, Sanmartí R. Rheumatoid arthritis in
Spain: Occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum
Dis* 2003; **62**: 897–900.
- 120 Aubart F, Crestani B, Nicaise-Roland P, Tubach F, Bollet C, Dawidowicz K *et al.* High Levels of Anti-
Cyclic Citrullinated Peptide Autoantibodies Are Associated with Co-occurrence of Pulmonary
Diseases with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 2011; **38**: 979–982.
- 121 Turesson C, Jacobsson LTH, Sturfelt G, Matteson EL, Mathsson L, Rönnelid J. Rheumatoid factor
and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular
manifestations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: 59–64.
- 122 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**: 1282–1289.
- 123 Kelly CA, Network on behalf of the BRIL (BRILL), Saravanan V, Network on behalf of the BRIL (BRILL),
Nisar M, Network on behalf of the BRIL (BRILL) *et al.* Rheumatoid arthritis-related interstitial lung
disease: associations, prognostic factors and physiological and radiological characteristics—a large
multicentre UK study. *Rheumatology* 2014; **53**: 1676–1682.
- 124 Juge P-A, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S *et al.* MUC5B Promoter Variant and
Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *New England Journal of Medicine* 2018; **379**:
2209–2219.
- 125 Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Casafont-Solé
I *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.
- 126 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis
classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against
Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 2569–2581.
- 127 Rose HM, Ragan C, Pearce E, Lipman MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep
erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Society for
Experimental Biology and Medicine* 1948; **68**: 1–6.
- 128 Pike RM, Sulkin SE, Coggeshall HC. Serological Reactions in Rheumatoid Arthritis: I. Factors Affecting
the Agglutination of Sensitized Sheep Erythrocytes in Rheumatoid-Arthritis Serum. *The Journal of
Immunology* 1949; **63**: 441–446.
- 129 Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis Markers* 2013;
35: 727.
- 130 Børretzen M, Chapman C, Natvig JB, Thompson KM. Differences in mutational patterns between
rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line
gene usage. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 735–741.
- 131 Nell VPK, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M *et al.* Autoantibody profiling as
early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**: 1731–1736.
- 132 Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S *et al.* Meta-analysis: Diagnostic
accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid
arthritis. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 797–808.
- 133 Sun J, Zhang Y, Liu L, Liu G. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide
antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol*
2014; **32**: 11–21.
- 134 Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H *et al.* Antibodies
Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of
Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 2741–2749.
- 135 Dörner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 2004;
16: 246–253.

- 136 Zavala-Cerna MG, Martínez-García EA, Torres-Bugarín O, Rubio-Jurado B, Riebeling C, Nava A. The Clinical Significance of Posttranslational Modification of Autoantigens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2014 47:1 2014; **47**: 73–90.
- 137 Schellekens GA, van de Putte LB, van Venrooij WJ, Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* 1998; **101**: 273–281.
- 138 Gomara MJ, Haro I. Citrullinated peptides in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Curr Top Med Chem* 2013; **13**: 743–751.
- 139 van Venrooij WJ, Pruijn GJM. How citrullination invaded rheumatoid arthritis research. *Arthritis Res Ther* 2014; **16**: 103.
- 140 Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2000; **43**: 155–163.
- 141 Pérez ML, Gómara MJ, Ercilla G, Sanmartí R, Haro I. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2007; **50**: 3573–3584.
- 142 Sanmartí R, Graell E, Perez ML, Ercilla G, Viñas O, Gómez-Puerta JA *et al.* Diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric fibrin/filaggrin citrullinated synthetic peptides in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**: 1–9.
- 143 Joshua V, Schobers L, Titcombe PJ, Israelsson L, Rönnelid J, Hansson M *et al.* Antibody responses to de novo identified citrullinated fibrinogen peptides in rheumatoid arthritis and visualization of the corresponding B cells. *Arthritis Res Ther* 2016; **18**: 1–9.
- 144 Malakoutikhah M, Gómara MJ, Gómez-Puerta JA, Sanmartí R, Haro I. The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2011; **54**: 7486–7492.
- 145 Liang B, Ge C, Lönnblom E, Lin X, Feng H, Xiao L *et al.* The autoantibody response to cyclic citrullinated collagen type II peptides in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2019; **58**: 1623–1633.
- 146 Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P *et al.* Antibodies to citrullinated α -enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 3009–3019.
- 147 Ge C, Holmdahl R. The structure, specificity and function of anti-citrullinated protein antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2019; **15**: 503–508.
- 148 Sokolova M v., Schett G, Steffen U. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis: Historical Background and Novel Findings. *Clin Rev Allergy Immunol* 2021; **63**: 138–151.
- 149 Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GMC, Drijfhout JW, Huizinga TWJ *et al.* Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev* 2014; **13**: 225–230.
- 150 Shi J, van Steenbergen HW, van Nies JAB, Levarht EWN, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM *et al.* The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; **17**.
- 151 Shi J, Willemze A, Janssen GMC, 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**: 148–150.
- 152 Reed E, Jiang X, Kharlamova N, Ytterberg AJ, Catrina AI, Israelsson L *et al.* Antibodies to carbamylated α -enolase epitopes in rheumatoid arthritis also bind citrullinated epitopes and are largely indistinct from anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Res Ther* 2016; **18**: 1–9.
- 153 Ajeganova S, van Steenbergen HW, Verheul MK, Forslind K, Hafström I, Toes REM *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**: 112–118.
- 154 Trouw LA, Rispens T, Toes REM. Beyond citrullination: Other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017; **13**: 331–339.
- 155 Verheul MK, Böhringer 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. *Arthritis & Rheumatology* 2018; **70**: 1721–1731.

- 156 Ponchel F, van Delft MAM, Xie X, Burska AN, Duquenne L, Trouw LA *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies: Are they useful for the diagnosis of rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol* 2021; **39**: 146–150.
- 157 Mowen KA, David M. Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. *Nature Immunology* 2014 *15*:6 2014; **15**: 512–520.
- 158 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**: 1099–1107.
- 159 Studenic P, Alunno A, Sieghart D, Bang H, Aletaha D, Blüml S *et al.* Presence of anti-acetylated peptide antibodies (AAPA) in inflammatory arthritis and other rheumatic diseases suggests discriminative diagnostic capacity towards early rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2021; **13**.
- 160 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**: 399–407.
- 161 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 and Rheumatology* 2015; **67**: 645–655.
- 162 Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* 1996; **23**: 872–880.
- 163 Grönwall C, Amara K, Hardt U, Krishnamurthy A, Steen J, Engström M *et al.* Autoreactivity to malondialdehyde-modifications in rheumatoid arthritis is linked to disease activity and synovial pathogenesis. *J Autoimmun* 2017; **84**: 29–45.
- 164 Kearley ML, Patel A, Chien J, Tuma DJ. Observation of a New Nonfluorescent Malondialdehyde–Acetaldehyde– Protein Adduct by ¹³C NMR Spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 1999; **12**: 100–105.
- 165 Xu D, Thiele GM, Kearley ML, Haugen MD, Klassen LW, Sorrell MF *et al.* Epitope Characterization of Malondialdehyde– Acetaldehyde Adducts Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Chem Res Toxicol* 1997; **10**: 978–986.
- 166 Darrah E, Andrade F. Editorial: Citrullination, and carbamylation, and malondialdehyde-acetaldehyde! oh my! entering the forest of autoantigen modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2015; **67**: 604–608.
- 167 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 & Rheumatology* 2019; **71**: 1483–1493.
- 168 Mikuls TR, Duryee MJ, England BR, Anderson DR, Hearth-Holmes M, Su K *et al.* Malondialdehyde–acetaldehyde antibody concentrations in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Int Immunopharmacol* 2018; **56**: 113–118.
- 169 Hill GE, Miller JA, Baxter BT, Klassen LW, Duryee MJ, Tuma DJ *et al.* Association of malondialdehyde–acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury. *Atherosclerosis* 1998; **141**: 107–116.
- 170 Anderson DR, Duryee MJ, Shurmur SW, Um JY, Bussey WD, Hunter CD *et al.* Unique Antibody Responses to Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA)-Protein Adducts Predict Coronary Artery Disease. *PLoS One* 2014; **9**: e107440.
- 171 Rolla R, Vay D, Mottaran E, Parodi M, Traverso N, Aricó S *et al.* Detection of circulating antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2000; **31**: 878–884.
- 172 Duryee MJ, Ahmad R, Eichele DD, Hunter CD, Mitra A, Talmon GA *et al.* Identification of Immunoglobulin G Autoantibody Against Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts as a Novel Serological Biomarker for Ulcerative Colitis. *Clin Transl Gastroenterol* 2022; **13**: E00469.
- 173 Gómez González C, Pérez Castán JF, Martín JLR. Introduction course to clinical research. Chapter 8: Diagnostic tests. Concordance. *Semergen* 2007; **33**: 509–519.
- 174 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1988; **31**: 315–324.

- 175 Banal F, Dougados M, Combes C, Gossec L. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2009; **68**: 1184–1191.
- 176 Gómez A. Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. *Reumatol Clin* 2011; **6**: 33–37.
- 177 Saraux A, Berthelot JM, Chalès G, le Henaff C, Thorel JB, Hoang S *et al*. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 2485–2491.
- 178 Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (United Kingdom)* 2012; **51**: 5–9.
- 179 Tenstad HB, Nilsson AC, Dellgren CD, Lindegaard HM, Rubin KH, Lillevang ST. Predictive values of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in relation to serological aspects of the ACR/EULAR 2010 classification criteria for rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2020; **49**: 18–20.
- 180 Nordberg LB, Lillegraven S, Lie E, Aga AB, Olsen IC, Hammer HB *et al*. Patients with seronegative RA have more inflammatory activity compared with patients with seropositive RA in an inception cohort of DMARD-naïve patients classified according to the 2010 ACR/EULAR criteria. *Ann Rheum Dis* 2017; **76**: 341–345.
- 181 Boeters DM, Gaujoux-Viala C, Constantin A, van der Helm-van Mil AHM. The 2010 ACR/EULAR criteria are not sufficiently accurate in the early identification of autoantibody-negative rheumatoid arthritis: Results from the Leiden-EAC and ESPOIR cohorts. *Semin Arthritis Rheum* 2017; **47**: 170–174.
- 182 Humphreys JH, Verheul MK, Barton A, MacGregor AJ, Lunt M, Toes REM *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**: 1139–1144.
- 183 Cabrera-Villalba S, Sanmartí R. Reumatismo Palindrómico. *Revista Paraguaya de Reumatología* 2015; **1**: 30–36.
- 184 Guerne PA, Weisman MH. Palindromic rheumatism: Part of or apart from the spectrum of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1992; **93**: 451–460.
- 185 Sanmartí R, Haro I, Cañete JD. Palindromic rheumatism: a unique and enigmatic entity with a complex relationship with rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2021; **17**: 375–384.
- 186 Sanmartí R, Frade-Sosa B, Morlà R, Castellanos-Moreira R, Cabrera-Villalba S, Ramirez J *et al*. Palindromic Rheumatism: Just a Pre-rheumatoid Stage or Something Else? *Front Med (Lausanne)* 2021; **8**: 315.
- 187 Wajed MA, Brown DL, Currey HLF. Palindromic rheumatism. Clinical and serum complement study. *Ann Rheum Dis* 1977; **36**: 56–61.
- 188 Salvador G, Gomez A, Viñas O, Ercilla G, Cañete JD, Muñoz-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**: 972–975.
- 189 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**: 992–994.
- 190 Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Salvador G, Ruiz-Esquide V, Hernández 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**: 1650–1655.
- 191 Cabrera-Villalba S, Gomara MJ, Cañete JD, Ramírez 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**.
- 192 Castellanos-Moreira R, Rodriguez-Garcia SC, Cabrera-Villalba S, Gomara MJ, Salvador G, Ruiz-Esquide V *et al*. Anti-carbamylated protein antibody isotype pattern differs between palindromic rheumatism and rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2020; **12**.
- 193 Frade-Sosa B, Morlà R, Tobalina L, Perez-Garcia C, Haro I, Sanmartí R. AB0196 Abatacept vs Hydroxychloroquine in Palindromic Rheumatism: A multicenter randomized clinical trial (PALABA study): Trial design and patients characteristics. *Ann Rheum Dis* 2022; **81**: 1227–1227.
- 194 van Regenmortel MHV. What is a b-cell epitope? *Methods in Molecular Biology* 2009; **524**: 3–20.

- 195 Ilinkaya AN, Dobrovolskaia MA. Understanding the immunogenicity and antigenicity of
nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; **299**: 70–77.
- 196 Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and in Silico
Epitope Prediction. *J Immunol Res* 2016; **2016**.
- 197 van Regenmortel MHV. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals* 2001;
29: 209–213.
- 198 Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic
determinants. *Nature* 1986; **322**: 747–748.
- 199 Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell
Epitope Prediction. *J Immunol Res* 2017; **2017**.
- 200 Levitt M. Nature of the protein universe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 11079–11084.
- 201 Correia BE, Ban YEA, Holmes MA, Xu H, Ellingson K, Kraft Z *et al*. Computational Design of Epitope-
Scaffolds Allows Induction of Antibodies Specific for a Poorly Immunogenic HIV Vaccine Epitope.
Structure 2010; **18**: 1116–1126.
- 202 Toride King M, Brooks CL. Epitope mapping of antibody-antigen interactions with X-ray
crystallography. *Methods in Molecular Biology* 2018; **1785**: 13–27.
- 203 Atkinson SC, Armistead JS, Mathias DK, Sandeu MM, Tao D, Borhani-Dizaji N *et al*. The Anopheles-
midgut APN1 structure reveals a new malaria transmission–blocking vaccine epitope. *Nat Struct
Mol Biol* 2015; **22**: 532–539.
- 204 Raghunathan G, Hsieh E, Ermakov G. Epitope characterization and isotype selection. *Development
of Antibody-Based Therapeutics: Translational Considerations and Challenges* 2018; : 41–69.
- 205 Opuni KFM, Al-Majdoub M, Yefremova Y, El-Kased RF, Koy C, Glocker MO. Mass spectrometric
epitope mapping. *Mass Spectrom Rev* 2018; **37**: 229–241.
- 206 Liu XR, Huang RYC, Zhao F, Chen G, Tao L. Advances in mass spectrometry-based epitope mapping
of protein therapeutics. *J Pharm Biomed Anal* 2022; **215**: 114754.
- 207 Ahmad TA, Eweida AE, Sheweita SA. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective
diagnostics. *Trials Vaccinol* 2016; **5**: 71–83.
- 208 Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*
1963; **85**: 2149–2154.
- 209 Ibsen KN, Daugherty PS. Prediction of antibody structural epitopes via random peptide library
screening and next generation sequencing. *J Immunol Methods* 2017; **451**: 28–36.
- 210 Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous
antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986; **23**: 709–715.
- 211 Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D, Molina F. Discontinuous epitope prediction based on
mimotope analysis. *Bioinformatics* 2006; **22**: 1088–1095.
- 212 Braun R, Schönberger N, Vinke S, Lederer F, Kalinowski J, Pollmann K. Application of Next
Generation Sequencing (NGS) in Phage Displayed Peptide Selection to Support the Identification of
Arsenic-Binding Motifs. *Viruses* 2020; **12**: 1360.
- 213 Casey JL, Coley AM, Street G, Parisi K, Devine PL, Foley M. Peptide mimotopes selected from a
random peptide library for diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 764–
771.
- 214 Klinger M, Kong K, Moorhead M, Weng L, Zheng J, Faham M. Combining Next-Generation
Sequencing and Immune Assays: A Novel Method for Identification of Antigen-Specific T Cells. *PLoS
One* 2013; **8**: e74231.
- 215 Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci* 2016; **7**: 842–854.
- 216 Gomara M, Haro I. Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Human Diseases. *Curr Med Chem*
2007; **14**: 531–546.
- 217 Pandey S, Malviya G, Chottova Dvorakova M. Role of Peptides in Diagnostics. *International Journal
of Molecular Sciences* 2021; **22**: 8828.
- 218 San Segundo-Acosta P, Montero-Calle A, Fuentes M, Rábano A, Villalba M, Barderas R.
Identification of Alzheimer’s Disease Autoantibodies and Their Target Biomarkers by Phage
Microarrays. *J Proteome Res* 2019; **18**: 2940–2953.
- 219 Guevarra LA, Afable ACF, Belza PJO, Dy KJS, Lee SJQ, Sy-Ortin TT *et al*. Immunogenicity of a Fap2
peptide mimotope of *Fusobacterium nucleatum* and its potential use in the diagnosis of colorectal
cancer. *Infect Agent Cancer* 2018; **13**: 1–6.

- 220 Chen Y, Zhang S, Hong Z, Lin Y, Dai H. A mimotope peptide-based dual-signal readout competitive enzyme-linked immunoassay for non-toxic detection of zearalenone †. *J Mater Chem B* 2019; **7**: 6972.
- 221 Zhu T, He J, Chen W, Ho HP, Kong SK, Wang C *et al.* Development of peptide-based chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for diagnosis of dengue virus infection in human. *Anal Biochem* 2018; **556**: 112–118.
- 222 Cai XF, Chen J, Hu J li, Long QX, Deng HJ, Liu P *et al.* A Peptide-Based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* 2020; **222**: 189–193.
- 223 Sachse K, Rahman KS, Schnee C, Müller E, Peisker M, Schumacher T *et al.* A novel synthetic peptide microarray assay detects Chlamydia species-specific antibodies in animal and human sera. *Scientific Reports* 2018 *8:1* 2018; **8**: 1–13.
- 224 Vanova V, Mitrevska K, Milosavljevic V, Hynek D, Richtera L, Adam V. Peptide-based electrochemical biosensors utilized for protein detection. *Biosens Bioelectron* 2021; **180**: 113087.
- 225 Yoshida CF, Rouzere CD, Nogueira RM, Lampe E, Travassos-da-Rosa MA, Vanderborcht BO *et al.* Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* 1992; **25**: 1131–1135.
- 226 Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJLM *et al.* Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 584–587.
- 227 Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* 2014; **19**: 590–601.
- 228 van Regenmortel MHV. Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays. *Ann Biol Clin (Paris)* 1993; **51**: 39–41.
- 229 Leinikki P, Lehtinen M, Hyöty H, Parkkonen P, Kantanen ML, Hakulinen J. Synthetic Peptides as Diagnostic Tools in Virology. *Adv Virus Res* 1993; **42**: 149–186.
- 230 Wang JJG, Steel S, Wisniewolski R, Chang A, Wang YI. Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type III by using a synthetic peptide of 21 amino acid residues corresponding to a highly antigenic segment of gp4I envelope protein (epitope/serodiagnosis). *Medical Sciences* 1986; **83**: 6159–6163.
- 231 Henderson, LE, Sowder R, Copeland, Stephen Oroszlan TD, Arthur L O, Robey WG, Fischinger PJ. Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *J Virol* 1987; **61**: 629–632.
- 232 Prabhala BK, Mirza O, Højrup P, Hansen PR. Characterization of Synthetic Peptides by Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 2015; **1348**: 77–82.
- 233 Kessenbrock K, Rajmakers R, Fritzler M, Mahler M. Synthetic peptides: the future of patient management in systemic rheumatic diseases? *Curr Med Chem* 2007; **14**: 2831–2838.
- 234 Gómara MJ, Haro I. Peptide-Based Diagnostic Assays. In: Khudyakov Y (ed). *Medicinal Protein Engineering*. Taylor & Francis Group, 2009, pp 333–352.
- 235 Smits NGE, Bovee TFH, Pujari SP, van Ginkel LA, Nielen MWF, Albada B. Microsphere Peptide-Based Immunoassay for the Detection of Recombinant Bovine Somatotropin in Injection Preparations. *Biosensors (Basel)* 2022; **12**: 138.
- 236 Heyduk E, Hickey R, Pozzi N, Heyduk T. Peptide ligand-based ELISA reagents for antibody detection. *Anal Biochem* 2018; **559**: 55–61.
- 237 Moudgil KD, Sercarz EE, Grewal IS. Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunol Today* 1998; **19**: 217–220.
- 238 García-Moreno C, Gómara MJ, Castellanos-Moreira R, Sanmartí R, Haro I. Peptides bearing multiple post-translational modifications as antigenic targets for severe rheumatoid arthritis patients. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 13290.
- 239 Dyson HJ, Wright PE. Defining solution conformations of small linear peptides. *Annu Rev Biophys Chem* 1991; **20**: 519–538.
- 240 Dyson HJ, Wright PE. Antigenic peptides. *The FASEB Journal* 1995; **9**: 37–42.
- 241 L JA, Rivas G, Andreu D, Melero JA, Bruix M. Conformational Studies of a Short Linear Peptide Corresponding to a Major Conserved Neutralizing Epitope of Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein. *Biopolymers* 1995; **39**: 537–548.

- 242 Hudecz F. Manipulation of Epitope Function by Modification of Peptide Structure: A Minireview. *Biologicals* 2001; **29**: 197–207.
- 243 Uray K, Kajtár J, Vass E, Price MR, Hollósi M, Hudecz F. Effect of Solution Conformation on Antibody Recognition of a Protein Core Epitope from Gastrointestinal Mucin (MUC2). *Arch Biochem Biophys* 1999; **361**: 65–74.
- 244 Léonetti M, Pillet L, Maillère B, Lamthanh H, Frachon P, Couderc J *et al.* Immunization with a peptide having both T cell and conformationally restricted B cell epitopes elicits neutralizing antisera against a snake neurotoxin. *The Journal of Immunology* 1990; **145**.
- 245 Conley AJ, Conard P, Bondy S, Dolan CA, Hannah J, Leanza WJ *et al.* Immunogenicity of synthetic HIV-1 gp120 V3-loop peptide-conjugate immunogens. *Vaccine* 1994; **12**: 445–451.
- 246 Zhou K, Lu J, Yin X, Xu H, Li L, Ma B. Structure-based derivation and intramolecular cyclization of peptide inhibitors from PD-1/PD-L1 complex interface as immune checkpoint blockade for breast cancer immunotherapy. *Biophys Chem* 2019; **253**: 106213.
- 247 Avitabile C, Capparelli R, Rigano MM, Fulgione A, Barone A, Pedone C *et al.* Antimicrobial peptides from plants: stabilization of the γ core of a tomato defensin by intramolecular disulfide bond. *Journal of Peptide Science* 2013; **19**: 240–245.
- 248 Andreu D, Albericio F, Solé NA, Munson MC, Ferrer M, Barany G. Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins. *Methods in Molecular Biology* 1994; **35**: 91–169.
- 249 Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SBH. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science (1979)* 1994; **266**: 776–779.
- 250 Hill TA, Shepherd NE, Diness F, Fairlie DP. Constraining Cyclic Peptides To Mimic Protein Structure Motifs. *Angewandte Chemie International Edition* 2014; **53**: 13020–13041.
- 251 Gomes P, Giralt E, Andreu D. Antigenicity modulation upon peptide cyclization: application to the GH loop of foot-and-mouth disease virus strain C1-Barcelona. *Vaccine* 2001; **19**: 3459–3466.
- 252 Pyun JC, Cheong MY, Park SH, Kim HY, Park JS. Modification of short peptides using ϵ -aminocaproic acid for improved coating efficiency in indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *J Immunol Methods* 1997; **208**: 141–149.
- 253 Imanaka H, Yamadzumi D, Yanagita K, Ishida N, Nakanishi K, Imamura K. The use of a proteinaceous “cushion” with a polystyrene-binding peptide tag to control the orientation and function of a target peptide adsorbed to a hydrophilic polystyrene surface. *Biotechnol Prog* 2016; **32**: 527–534.
- 254 Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altchek J, Bracamonte E, Marco JD *et al.* Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; **11**: e0005972.
- 255 Fargeas C, Hommel M, Maingon R, Dourado C, Monsigny M, Mayer R. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 241–248.
- 256 Gómara MJ, Riedemann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods* 2000; **234**: 23–34.
- 257 Gegg C v., Etzler ME. Directional Coupling of Synthetic Peptides to Poly-L-Lysine and Applications to the ELISA. *Anal Biochem* 1993; **210**: 309–313.
- 258 Loomans EEMG, Petersen-van Etteken A, Bloemers HPJ, Schielen WJG. Direct Coating of Poly(Lys) or Acetyl-thio-acetyl Peptides to Polystyrene: The Effects in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Anal Biochem* 1997; **248**: 117–129.
- 259 Kumada Y, Tokunaga Y, Imanaka H, Imamura K, Sakiyama T, Katoh S *et al.* Screening and Characterization of Affinity Peptide Tags Specific to Polystyrene Supports for the Orientated Immobilization of Proteins. *Biotechnol Prog* 2006; **22**: 401–405.
- 260 Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG *et al.* Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics* 2000 26:3 2000; **26**: 283–289.
- 261 Gómara MJ, Rodríguez J, Bleda MJ, Salvador JP, Sanmartí R, Haro I. 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.
- 262 MacBeath G, Schreiber SL. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science (1979)* 2000; **289**: 1760–1763.
- 263 Benters R, Niemeyer CM, Wöhrle D. Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *ChemBioChem* 2001; **2**: 686–694.

- 264 Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M. Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions. *Biomol Eng* 2006; **23**: 77–88.
- 265 Cuccuru MA, Dessì D, Rappelli P, Fiori PL. A simple, rapid and inexpensive technique to bind small peptides to polystyrene surfaces for immunoenzymatic assays. *J Immunol Methods* 2012; **382**: 216–219.
- 266 Fischer PM, Howden MEH. Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Anti-Peptide Antibodies Using Capture of Biotinylated Peptides By Immobilized Avidin. *J Immunoassay* 1990; **11**: 311–327.
- 267 Launer H, Fraenkel-Conrat H. The avidin-biotin equilibrium. *Journal of Biological Chemistry* 1951; **193**: 125–132.
- 268 Vermette P, Gengenbach T, Divisekera U, Kambouris PA, Griesser HJ, Meagher L. Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers. *J Colloid Interface Sci* 2003; **259**: 13–26.
- 269 Green NM. Avidin. 1. The use of (14-C) Biotin for kinetic studies and for assay. *Biochem J* 1963; **89**: 585–591.
- 270 Jones CJP, Mosley SM, Jeffrey IJM, Stoddart RW. Elimination of the non-specific binding of avidin to tissue sections. *Histochem J* 1987; **19**: 264–268.
- 271 Bayer EA, Wilchek M. Application of avidin—biotin technology to affinity-based separations. *J Chromatogr A* 1990; **510**: 3–11.
- 272 Piran U, Riordan WJ. Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *J Immunol Methods* 1990; **133**: 141–143.
- 273 Izadi N, Černocká H, Trefulka M, Ostatná V. Influence of Protein Modification and Glycosylation in the Catalytic Hydrogen Evolution Reaction of Avidin and Neutravidin: An Electrochemical Analysis. *Chempluschem* 2020; **85**: 1347–1353.
- 274 Jain A, Barve A, Zhao Z, Jin W, Cheng K. Comparison of Avidin, Neutravidin, and Streptavidin as Nanocarriers for Efficient siRNA Delivery. *Mol Pharm* 2017; **14**: 1517–1527.
- 275 Yoon DJ, Jackman BK, Ju H, Jaffrezic-Renault N, Sut TN, Park H *et al*. Distinct Binding Properties of Neutravidin and Streptavidin Proteins to Biotinylated Supported Lipid Bilayers: Implications for Sensor Functionalization. *Sensors* 2022; **22**: 5185.
- 276 Gao X, Mathieu HJ, Schawaller M. Surface modification of polystyrene biochip for biotin-labelled protein/streptavidin or neutravidin coupling used in fluorescence assay. *Surface and Interface Analysis* 2004; **36**: 1507–1512.
- 277 Manocha M, Chitralekha KT, Thakar M, Shashikiran D, Paranjape RS, Rao DN. Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA) for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and type-2 (HIV-2) antibodies. *Immunol Lett* 2003; **85**: 275–278.
- 278 Andresen H, Grötzinger C, Zarse K, Kreuzer OJ, Ehrentreich-Förster E, Bier FF. Functional peptide microarrays for specific and sensitive antibody diagnostics. *Proteomics* 2006; **6**: 1376–1384.
- 279 Sélo I, Négroni L, Créminon C, Grassi J, Wal JM. Preferential labeling of α -amino N-terminal groups in peptides by biotin: application to the detection of specific anti-peptide antibodies by enzyme immunoassays. *J Immunol Methods* 1996; **199**: 127–138.
- 280 Babos F, Szarka E, Nagy G, Majer Z, Sármay G, Magyar A *et al*. Role of N - Or C -terminal biotinylation in autoantibody recognition of citrullin containing filaggrin epitope peptides in rheumatoid arthritis. *Bioconjug Chem* 2013; **24**: 817–827.
- 281 Pérez T, Ercilla G, Chan WC, Haro I. Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV. *Journal of Peptide Science* 2006; **12**: 267–278.
- 282 Hernández Marin M, Hernández Spengler I, Ramos Martínez G, Pozo Peña L. Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **339**: 89–92.
- 283 Hernández Marin M, Castellanos Pentón P, Márquez Bocalandro Y, Pozo Pea L, Díaz Navarro J, Javier González López L. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 1–6.
- 284 Hernández M, Pozo L, Gómez I, Melchor A. Chimeric Synthetic Peptide as Antigen for Immunodiagnosis of HIV-1 Infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **272**: 259–262.
- 285 Tam JP. Recent advances in multiple antigen peptides. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 17–32.
- 286 Kowalczyk W, Monsó M, de la Torre BG, Andreu D. Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)—strategies and limitations. *Journal of Peptide Science* 2011; **17**: 247–251.

- 287 Crowther JR. The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology* 2000; **149**.
- 288 Reen DJ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology* 1994; **32**: 461–466.
- 289 Douglas AS, Monteith CA. Improvements to immunoassays by use of covalent binding assay plates. *Clin Chem* 1994; **40**: 1833–1837.
- 290 Gibbs J, Kennebunk M. Selecting the detection system—colorimetric, fluorescent, luminescent methods. *Corning Life Sciences ELISA Technical Bulletin* 2001; **14**.
- 291 Hosseini S, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M, Martínez-Chapa SO. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): from A to Z*. Springer Singapore: Singapore, 2018.
- 292 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; **8**: 871–874.
- 293 van Weemen B, Schuurs A. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; **15**: 232–236.
- 294 Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides (NY)* 2015; **72**: 4–15.
- 295 Tsurusawa N, Chang J, Namba M, Makioka D, Yamura S, Iha K *et al*. Modified ELISA for ultrasensitive diagnosis. *J Clin Med* 2021; **10**.
- 296 Chatziharalambous D, Lygirou V, Latosinska A, Stravodimos K, Vlahou A, Jankowski V *et al*. Analytical Performance of ELISA Assays in Urine: One More Bottleneck towards Biomarker Validation and Clinical Implementation. *PLoS One* 2016; **11**: e0149471.
- 297 Zangar RC, Daly DS, White AM. ELISA microarray technology as a high-throughput system for cancer biomarker validation. *Expert Rev Proteomics* 2006; **3**: 37–44.
- 298 Diamandis EP. Biomarker validation is still the bottleneck in biomarker research. *J Intern Med* 2012; **272**: 620.
- 299 Ewis AA, Zhelev Z, Bakalova R, Fukuoka S, Shinohara Y, Ishikawa M *et al*. A history of microarrays in biomedicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; **5**: 315–328.
- 300 Marzancola MG, Sedighi A, Li PCH. DNA microarray-based diagnostics. *Methods in Molecular Biology* 2016; **1368**: 161–178.
- 301 Foong YM, Fu J, Yao SQ, Uttamchandani M. Current advances in peptide and small molecule microarray technologies. *Curr Opin Chem Biol* 2012; **16**: 234–242.
- 302 Kusnezow W, Hoheisel JD. Solid supports for microarray immunoassays. *Journal of Molecular Recognition* 2003; **16**: 165–176.
- 303 Liu L, Wu S, Jing F, Zhou H, Jia C, Li G *et al*. Bead-based microarray immunoassay for lung cancer biomarkers using quantum dots as labels. *Biosens Bioelectron* 2016; **80**: 300–306.
- 304 Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA microarrays: A powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine* 2007; **13**: 527–541.
- 305 Park S, Gildersleeve JC, Blixt O, Shin I. Carbohydrate microarrays. *Chem Soc Rev* 2013; **42**: 4310–4326.
- 306 Sutandy FXR, Qian J, Chen CS, Zhu H. Overview of Protein Microarrays. *Curr Protoc Protein Sci* 2013; **72**: 27.1.1-27.1.16.
- 307 Szymczak LC, Kuo HY, Mrksich M. Peptide Arrays: Development and Application. *Anal Chem* 2018; **90**: 266–282.
- 308 Frank R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J Immunol Methods* 2002; **267**: 13–26.
- 309 Antohe B v., Cooley PW. *In Situ Synthesis of Peptide Microarrays Using Ink-Jet Microdispensing*. Humana Press, 2007.
- 310 Breitling F, Felgenhauer T, Nesterov A, Lindenstruth V, Stadler V, Bischoff FR. Particle-Based Synthesis of Peptide Arrays. *ChemBioChem* 2009; **10**: 803–808.
- 311 Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science (1979)* 1991; **251**: 767–773.
- 312 Meng X, Wei J, Wang Y, Zhang H, Wang Z. The role of peptide microarrays in biomedical research. *Analytical Methods* 2018; **10**: 4614–4624.
- 313 Yeo DSY, Panicker RC, Tan L-P, Yao SQ. Strategies for Immobilization of Biomolecules in a Microarray. *Comb Chem High Throughput Screen* 2012; **7**: 213–221.
- 314 Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Peptide Science* 2002; **66**: 184–199.

- 315 van der Wal FJ, Jelsma T, Fijten H, Achterberg RP, Loeffen WLA. Towards a peptide-based suspension array for the detection of pestivirus antibodies in swine. *J Virol Methods* 2016; **235**: 15–20.
- 316 Cretich M, Gori A, D’Annessa I, Chiari M, Colombo G. Peptides for Infectious Diseases: From Probe Design to Diagnostic Microarrays. *Antibodies* 2019, Vol 8, Page 23 2019; **8**: 23.
- 317 Gori A, Cretich M, Vanna R, Sola L, Gagni P, Bruni G *et al.* Multiple epitope presentation and surface density control enabled by chemoselective immobilization lead to enhanced performance in IgE-binding fingerprinting on peptide microarrays. *Anal Chim Acta* 2017; **983**: 189–197.
- 318 Gori A, Sola L, Gagni P, Bruni G, Liprino M, Peri C *et al.* Screening Complex Biological Samples with Peptide Microarrays: The Favorable Impact of Probe Orientation via Chemoselective Immobilization Strategies on Clickable Polymeric Coatings. *Bioconjug Chem* 2016; **27**: 2669–2677.
- 319 Nimse SB, Song K, Sonawane MD, Sayyed DR, Kim T. Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications. *Sensors* 2014, Vol 14, Pages 22208–22229 2014; **14**: 22208–22229.
- 320 Nogues C, Leh H, Langendorf CG, Law RHP, Buckle AM, Buckle M. Characterisation of Peptide Microarrays for Studying Antibody-Antigen Binding Using Surface Plasmon Resonance Imagery. *PLoS One* 2010; **5**: e12152.
- 321 Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vöhringer CF, Joos TO. Protein microarray technology. *Drug Discov Today* 2002; **7**: 815–822.
- 322 Loreck K, Mitrenga S, Meemken D, Heinze R, Reissig A, Mueller E *et al.* Development of a miniaturized protein microarray as a new serological IgG screening test for zoonotic agents and production diseases in pigs. *PLoS One* 2019; **14**: e0217290.
- 323 Fernández Arauzo L. *Péptidos sintéticos del GB virus C. Aplicación en el diagnóstico de infección y en el diseño de potenciales agentes terapéuticos contra el VIH-1.* 2012.
- 324 Rueda L, Ali A. Introduction. In: Rueda L (ed). *Microarray Image and Data Analysis*. CRC Press: Boca Raton, 2014, pp 2–35.
- 325 Hansson M, Mathsson L, Schleder T, Israelsson L, Matsson P, Nogueira L *et al.* Validation of a multiplex chip-based assay for the detection of autoantibodies against citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2012; **14**: 1–12.
- 326 Rönnelid J, Turesson C, Kastbom A. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis - Laboratory and Clinical Perspectives. *Front Immunol* 2021; **12**.
- 327 van Venrooij WJ, van Beers JJBC, Pruijn GJM. Anti-CCP antibodies: The past, the present and the future. *Nat Rev Rheumatol* 2011; **7**: 391–398.
- 328 van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TWJ. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**: 1510–1512.
- 329 Berglin E, Johansson T, Sundin U, Jidell E, Wadell G, Hallmans G *et al.* Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**: 453–458.
- 330 Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 380–386.
- 331 Vos I, van Mol C, Trouw LA, Mahler M, Bakker JA, van Offel J *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays. *Clin Rheumatol* 2017; **36**: 1487–1492.
- 332 Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and Diagnostic Characteristics of 11 2nd- and 3rd-Generation Immunoenzymatic Methods for the Detection of Antibodies to Citrullinated Proteins. *Clin Chem* 2007; **53**: 1527–1533.
- 333 Verpoort KN, Jol-Van Der Zijde CM, Papendrecht-Van Der Voort EAM, Ioan-Facsinay A, Drijfhout JW, van Tol MJD *et al.* Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 3799–3808.
- 334 Haga HJ, Terp Andersen D, Peen E. Prevalence of IgA class antibodies to cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) in patients with primary Sjögren’s syndrome, and its association to clinical manifestations. *Clin Rheumatol* 2011; **30**: 369–372.
- 335 Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Rönnelid 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**: R13.

- 336 Bang H, Egerer K, Gauliard A, Lüthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G *et al.* Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 2503–2511.
- 337 van Steendam K, Tilleman K, Deforce D. The relevance of citrullinated vimentin in the production of antibodies against citrullinated proteins and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2011; **50**: 830–837.
- 338 Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Arthritis R *et al.* Antibodies Against Mutated Citrullinated Vimentin Are a Better Predictor of Disease Activity at 24 Months in Early Rheumatoid Arthritis Than Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptides. *J Rheumatol* 2008; **35**.
- 339 Zhu JN, Nie LY, Lu XY, Wu HX. Meta-analysis: Compared with anti-CCP and rheumatoid factor, could anti-MCV be the next biomarker in the rheumatoid arthritis classification criteria? *Clin Chem Lab Med* 2019; **57**: 1668–1679.
- 340 Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végyári A *et al.* Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2007 *34:1* 2007; **34**: 26–31.
- 341 Maraina CHC, Nurdayana AK, Rusni D, Azwany Y. Diagnostic value of anti-modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2010; **13**: 335–339.
- 342 Mutlu N, Bicakcigil M, Tasan DA, Kaya A, Yavuz S, Ozden AI. Comparative performance analysis of 4 different anti-citrullinated protein assays in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2009; **36**: 491–500.
- 343 Keskin G, Inal A, Keskin D, Pekel A, Baysal O, Dizer U *et al.* Diagnostic Utility of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Anti-Modified Citrullinated Vimentin Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Protein Pept Lett* 2008; **15**: 314–317.
- 344 Sghiri R, Bouajina E, Bargaoui D, Harzallah L, Fredj H ben, Sammoud S *et al.* Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008; **29**: 59–62.
- 345 Zhu T, Feng L. Comparison of anti-mutated citrullinated vimentin, anti-cyclic citrullinated peptides, anti-glucose-6-phosphate isomerase and anti-keratin antibodies and rheumatoid factor in the diagnosis of rheumatoid arthritis in Chinese patients. *Int J Rheum Dis* 2013; **16**: 157–161.
- 346 Kinloch A, Tatzler V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P *et al.* Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: 1–9.
- 347 Li H, Li L, Liu C, Cheng L, Yan S, Chen H *et al.* Diagnostic value of anti-citrullinated α -enolase peptide 1 antibody in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2021; **24**: 633–646.
- 348 Pérez ML, Gómara MJ, Kasi D, Alonso A, Viñas O, Ercilla G *et al.* Synthesis of overlapping fibrin citrullinated peptides and their use for diagnosing rheumatoid arthritis. *Chem Biol Drug Des* 2006; **68**: 194–200.
- 349 Sarin VK, Kent SBH, Tam JP, Merrifield RB. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 1981; **117**: 147–157.
- 350 Kikugawa K, Ido Y. Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* 1984; **19**: 600–608.
- 351 Thermo Scientific Nunc Immobilizer Amino Instruction protocol. 2012.
- 352 StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC. .
- 353 European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. London, 2011www.ema.europa.eu/contact.
- 354 Hanneman SK, Cox CD, Green KE, Kang DH. Estimating Intra-and Inter-Assay Variability in Salivary Cortisol. *Biol Res Nurs* 2011; **13**: 243–250.
- 355 Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW *et al.* Periodontitis and porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2014; **66**: 1090–1100.
- 356 Wagner CA, Sokolove J, Lahey LJ, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Alfredsson L *et al.* Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 ‘shared epitope’ alleles. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 579–586.

- 357 Chandra PE, Sokolove J, Hipp BG, Lindstrom TM, Elder JT, Reveille JD *et al.* Novel multiplex technology for diagnostic characterization of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**: 1–13.
- 358 Fernandez-Vidal M, Cubero M, Ercilla G, Gomara M, Haro I. Application of a chimeric synthetic peptide in the development of a serologic method for the diagnosis of hepatitis G virus infection. *Protein Pept Lett* 2007; **14**: 865–870.
- 359 Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Anal Biochem* 2010; **396**: 51–58.
- 360 Vossenaar E, Depres N, Lora M, van der Heijden A, Lapointe E, Zendman A *et al.* The rheumatoid arthritis specific Sa antigen is citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004 *6*:1 2004; **6**: 1–35.
- 361 Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004 *6*:2 2004; **6**: 1–9.
- 362 van Steendam K, Tilleman K, de Ceuleneer M, de Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther* 2010; **12**: 1–10.
- 363 Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T *et al.* The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of the α - and β -Chains of Fibrin. *The Journal of Immunology* 2001; **166**: 4177–4184.
- 364 Fernandes-Cerqueira C, Ossipova E, Gunasekera S, Hansson M, Mathsson L, Catrina AI *et al.* Targeting of anti-citrullinated protein/peptide antibodies in rheumatoid arthritis using peptides mimicking endogenously citrullinated fibrinogen antigens. *Arthritis Res Ther* 2015; **17**: 1–9.
- 365 Rönnelid J, Hansson M, Mathsson-Alm L, Cornillet M, Reed E, Jakobsson J *et al.* Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPA-positive rheumatoid arthritis patients with distinct genetic and environmental determinants. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2018; **77**: 203–211.
- 366 Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic Accuracy of the Anti-Citrulline Antibody Assay for Rheumatoid Arthritis. *Clin Chem* 2001; **47**: 1089–1093.
- 367 Kakumanu P, Yamagata H, Sobel ES, Reeves WH, Chan EKL, Satoh M. Patients with pulmonary tuberculosis are frequently positive for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, but their sera also react with unmodified arginine-containing peptide. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 1576–1581.
- 368 Vannini A, Cheung K, Fusconi M, Stammen-Vogelzangs J, Drenth JPH, Dall’Aglio AC *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide positivity in non-rheumatoid arthritis disease samples: citrulline-dependent or not? *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: 511.
- 369 Åhlin E, Elshafie AI, Nur MAM, Rönnelid J. Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in Sudanese Patients with *Leishmania donovani* Infection Exhibit Reactivity not Dependent on Citrullination. *Scand J Immunol* 2015; **81**: 201–208.
- 370 Layman H, Rickert KW, Wilson S, Aksyuk AA, Dunty JM, Natrakul D *et al.* Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous quantification of type-specific IgG antibodies to E6/E7 oncoproteins of HPV16 and HPV18. *PLoS One* 2020; **15**: e0229672.
- 371 van Heemst J, Trouw LA, Nogueira L, van Steenberg HW, van der Helm-van Mil AHM, Allaart CF *et al.* An investigation of the added value of an ACPA multiplex assay in an early rheumatoid arthritis setting. *Arthritis Res Ther* 2015; **17**: 1–10.
- 372 Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes REM. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens—common principles. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**: ii132–ii136.
- 373 Brink M, Hansson M, Mathsson L, Jakobsson PJ, Holmdahl R, Stenlund H *et al.* Multiplex Analyses of Antibodies Against Citrullinated Peptides in Individuals Prior to Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2013; **65**: 899–910.
- 374 Kwon E-J, Ju JH, Spinelli FR, Pecani A. Impact of Posttranslational Modification in Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Focusing on Citrullination, Carbamylation, and Acetylation. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 10576 2021; **22**: 10576.
- 375 Elsayed SA, Esmail MA, Ali RM, Mohafez OM. Diagnostic and prognostic value of anti-CarP antibodies in a sample of Egyptian rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol* 2019; **38**: 2683–2689.
- 376 Yee A, Webb T, Seaman A, Infantino M, Meacci F, Manfredi M *et al.* Anti-CarP antibodies as promising marker to measure joint damage and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 2015; **61**: 24–30.

- 377 Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes REM *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res Ther* 2015; **17**: 1–8.
- 378 Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes REM, Huizinga TWJ, Demoruelle MK *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *Journal of Rheumatology* 2015; **42**: 572–579.
- 379 van Delft MAM, Verheul MK, Burgers LE, Derksen VFAM, 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**: 1–12.
- 380 Xie S, Li S, Chen B, Zhu Q, Xu L, Li F. Serum anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor increase the risk of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2021; **40**: 4533–4543.
- 381 Giles JT, Danoff SK, Sokolove J, Wagner CA, Winchester R, Pappas DA *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**: 1487–1494.
- 382 Mikuls TR, Edison J, Meeshaw E, Sayles H, England BR, Duryee MJ *et al.* Autoantibodies to Malondialdehyde–Acetaldehyde Are Detected Prior to Rheumatoid Arthritis Diagnosis and After Other Disease Specific Autoantibodies. *Arthritis and Rheumatology* 2020; **72**: 2025–2029.
- 383 Vallbracht J, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; **63**: 1079–1084.
- 384 Ogdie A, Yu YD, Haynes K, Love TJ, Maliha S, Jiang Y *et al.* Risk of major cardiovascular events in patients with psoriatic arthritis, psoriasis and rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**: 326–332.
- 385 van Aken J, van Dongen H, le Cessie S, Allaart CF, Breedveld FC, Huizinga TWJ. Comparison of long term outcome of patients with rheumatoid arthritis presenting with undifferentiated arthritis or with rheumatoid arthritis: an observational cohort study. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**: 20–25.
- 386 Ajeganova S, Humphreys JH, Verheul MK, van Steenbergen HW, van Nies JAB, Svensson B *et al.* Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. *Ann Rheum Dis* 2016; **75**: 1924–1932.
- 387 Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LTH, Klareskog L, Nyberg F, Rantapää-Dahlqvist S *et al.* No increased occurrence of ischemic heart disease prior to the onset of rheumatoid arthritis: Results from two Swedish population-based rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 2861–2869.
- 388 Schipper LG, Vermeer M, Kuper HH, Hoekstra MO, Haagsma CJ, den Broeder AA *et al.* A tight control treatment strategy aiming for remission in early rheumatoid arthritis is more effective than usual care treatment in daily clinical practice: a study of two cohorts in the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring registry. *Ann Rheum Dis* 2012; **71**: 845–850.
- 389 Nikiphorou E, Norton S, Young A, Dixey J, Walsh D, Helliwell H *et al.* The association of obesity with disease activity, functional ability and quality of life in early rheumatoid arthritis: data from the Early Rheumatoid Arthritis Study/Early Rheumatoid Arthritis Network UK prospective cohorts. *Rheumatology* 2018; **57**: 1194–1202.
- 390 Mikuls TR, Fay BT, Michaud K, Sayles H, Thiele GM, Caplan L *et al.* Associations of disease activity and treatments with mortality in men with rheumatoid arthritis: results from the VARA registry. *Rheumatology* 2011; **50**: 101–109.
- 391 Vehkala L, Ukkola O, Kesäniemi YA, Kähönen M, Nieminen MS, Salomaa V *et al.* Plasma IgA antibody levels to malondialdehyde acetaldehyde-adducts are associated with inflammatory mediators, obesity and type 2 diabetes. *Ann Med* 2013; **45**: 501–510.
- 392 Duryee MJ, Klassen LW, Schaffert CS, Tuma DJ, Hunter CD, Garvin RP *et al.* Malondialdehyde–acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2010; **49**: 1480–1486.
- 393 Fuehrlein BS, Mota N, Arias AJ, Trevisan LA, Kachadourian LK, Krystal JH *et al.* The burden of alcohol use disorders in US military veterans: results from the National Health and Resilience in Veterans Study. *Addiction* 2016; **111**: 1786–1794.

- 394 Fogle BM, Tsai J, Mota N, Harpaz-Rotem I, Krystal JH, Southwick SM *et al.* The National Health and Resilience in Veterans Study: A Narrative Review and Future Directions. *Front Psychiatry* 2020; **11**: 1300.
- 395 McKinney WP, McIntire DD, Carmody TJ, Joseph A. Comparing the smoking behavior of veterans and nonveterans. *Public Health Reports* 1997; **112**: 212.
- 396 Brown DW. Smoking prevalence among US veterans. *J Gen Intern Med* 2010; **25**: 147–149.
- 397 Wyatt TA, Kharbanda KK, McCaskill ML, Tuma DJ, Yanov D, DeVasure J *et al.* Malondialdehyde–acetaldehyde-adducted protein inhalation causes lung injury. *Alcohol* 2012; **46**: 51–59.
- 398 Sapkota M, Wyatt TA, Osna N, Kharbanda K. Alcohol, Aldehydes, Adducts and Airways. *Biomolecules* 2015, Vol 5, Pages 2987–3008 2015; **5**: 2987–3008.
- 399 Wyatt TA, Warren KJ, Wetzel TJ, Suwondo T, Rensch GP, DeVasure JM *et al.* Malondialdehyde–Acetaldehyde Adduct Formation Decreases Immunoglobulin A Transport across Airway Epithelium in Smokers Who Abuse Alcohol. *Am J Pathol* 2021; **191**: 1732–1742.
- 400 Thiele GM, Duryee MJ, Willis MS, Sorrell MF, Freeman TL, Tuma DJ *et al.* Malondialdehyde–acetaldehyde (MAA) modified proteins induce pro-inflammatory and pro-fibrotic responses by liver endothelial cells. *Comparative Hepatology* 2004 3:1 2004; **3**: 1–4.
- 401 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol* 2014; **5**.
- 402 Castellanos-Moreira R, Ruiz-Esquivé V, Gómara MJ, Cabrera-Villalba S, Rodríguez-García S, Salvador G *et al.* Anti Carbamylated Protein Antibodies (CarP) in Palindromic Rheumatism: Prevalence and Clinical Significance. In: *ACR Meeting Abstracts*. ACR: San Diego, California, 2017<https://acrabstracts.org/abstract/anti-carbamylated-protein-antibodies-carp-in-palindromic-rheumatism-prevalence-and-clinical-significance/>.
- 403 Chila-Moreno L, Rodríguez L, Bautista-Molano W, Bello-Gualtero J, Ramos-Casallas A, Romero-Sánchez C. Anti-carbamylated protein and peptide antibodies as potential inflammatory joint biomarkers in the relatives of rheumatoid arthritis patients. *Int J Rheum Dis* 2020; **23**: 1698–1706.
- 404 Novella-Navarro M, Plasencia-Rodríguez C, Nuño L, Balsa A. Risk Factors for Developing Rheumatoid Arthritis in Patients With Undifferentiated Arthritis and Inflammatory Arthralgia. *Front Med (Lausanne)* 2021; **8**: 896.
- 405 Truchetet M, Dublanc S, Barnetche T, Vittecoq O, Mariette X, Richez C *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 & rheumatology* 2017; **69**: 2292–2302.
- 406 Scinocca M, Bell DA, Racapé M, Joseph R, Shaw G, McCormick JK *et al.* Antihomocitrullinated fibrinogen antibodies are specific to rheumatoid arthritis and frequently bind citrullinated proteins/peptides. *Journal of Rheumatology* 2014; **41**: 270–279.
- 407 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**: 1–10.
- 408 Brevet P, Lattard C, Guillou C, Rottenberg P, Fardellone P, Le-Loet X *et al.* Anti-Carbamylated Fibrinogen Antibodies Might Be Associated With a Specific Rheumatoid Phenotype and Include a Subset Recognizing In Vivo Epitopes of Its γ Chain One of Which Is Not Cross Reactive With Anti-Citrullinated Protein Antibodies. *Front Immunol* 2021; **12**.
- 409 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 & Rheumatology* 2020; **72**: 251–261.

Annexos

Els annexos inclosos a continuació són diferents articles i comunicacions publicades en relació als resultats obtinguts en els diferents estudis que formen part d'aquesta tesi doctoral:

1) Article 1:

García-Moreno C, Gómara MJ, Bleda MJ, Sanmartí R, Haro I (2019) Development of a multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides as proof of concept for diagnosis of rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* 14(5): e0215927.

2) Article 2:

García-Moreno C, Gómara M. J., Castellanos-Moreira R, Sanmartí R, & Haro I. (2021). Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Severe Rheumatoid Arthritis Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13290

3) Article 3:

García-Moreno C, Gómara MJ, Sanmartí R, Haro I. Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Biomarkers towards Personalized Rheumatology. In: Lebl M (ed). *Proceedings of the 36th European Peptide Symposium*. 2022, pp 171–172.

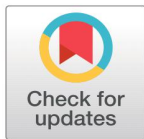
4) Abstract publicat:

García-Moreno C, Morlà R, Frade-Sosa B, Tobalina L, Gómara MJ, Sanmartí R, Haro I. on behalf of PALABA study investigators., et al (2022). AB0192 Antibodies against modified protein/peptide specificities in recent-onset palindromic rheumatism may determine the evolution to rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*;81:1225-1226

Article 1

RESEARCH ARTICLE

Development of a multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides as proof of concept for diagnosis of rheumatoid arthritis

Cristina García-Moreno¹, María José Gómara¹, María José Bleda¹, Raimon Sanmartí², Isabel Haro^{1*}**1** Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain, **2** Arthritis Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain* isabel.haro@iqac.csic.es

Abstract

Anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs) are the most specific serological biomarkers for rheumatoid arthritis (RA). They have both diagnostic and prognostic value, and are related to more aggressive joint disease in RA. However, a single biomarker cannot differentiate RA subtypes. So, simultaneous analysis of target citrullinated peptides, using a multiplex array based on chimeric peptides composed of several domains of human proteins, could be useful. In this work, eight chimeric peptides and the corresponding native arginine-containing control peptides were obtained by solid-phase peptide synthesis. The study included RA and psoriatic arthritis (PsA) patients attending the Rheumatology Unit of the Hospital Clinic in Barcelona, as well as healthy blood donors (BD) at the same hospital. Our main aim was to explore the diagnostic value of the novel multiplex array compared to a commercial ELISA-based ACPA assay in a serum-saving way. Using the combination of the eight chimeric peptide antigens in the multiplex array, 61.4% of the RA cohort were positive for 3 or more peptides; while, the healthy BD and PsA cohorts did not show any reactivity with the tested peptides. These results indicate that we have developed a highly specific multiplex assay based of chimeric citrullinated peptides derived from filaggrin, fibrin, vimentin and human enolase proteins for the detection of ACPAs in a serum-saving way.

OPEN ACCESS

Citation: García-Moreno C, Gómara MJ, Bleda MJ, Sanmartí R, Haro I (2019) Development of a multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides as proof of concept for diagnosis of rheumatoid arthritis. PLoS ONE 14(5): e0215927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927>

Editor: Salvatore V. Pizzo, Duke University School of Medicine, UNITED STATES

Received: January 10, 2019

Accepted: April 10, 2019

Published: May 2, 2019

Copyright: © 2019 García-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are included in manuscript and Supporting Information files.

Funding: IH, MJG and MJB received financial support from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) and the European Regional Development Fund (Grant CTQ2015-63919-R). MJG, MJB, RS and IH are members of the consolidated PEP-REU research group of the Generalitat de Catalunya (expedient: 2017 SGR 254). MJG, RS and IH belong to the Red

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and incapacitating inflammatory disease of the joints which is estimated to affect 0.5%-1% of the population worldwide. Long-lasting and the more severe cases can also develop into a systemic disease and have extra-articular effects [1,2]. As symptoms do not always appear in the early stages of the disease, there is a clear need to improve both the precision of specific tests for its diagnosis, and its early differentiation from other rheumatic diseases that affect the articulations and connective tissue. This is especially so in the case of patients with a poor prognosis or those in the early developmental stages of the disease.

Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS): "Red de Investigación en Inflamación y Enfermedades Reumáticas" (RIER) financed by the Instituto de Salud Carlos III (Grant RD12/0009/0016).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

In recent years, several posttranslational modifications have been reported in the context of RA, such as citrullination and carbamylation of proteins as well as proteins containing MAA (malondialdehyde-acetaldehyde) adducts which co-localize in the inflamed synovial tissue of RA patients [3,4]. However, the highest specificity for the diagnosis of RA is achieved via analysis of deiminated peptides or proteins, i.e., epitopes containing citrulline residues [5]. Anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs) are the most specific serological biomarkers for RA. They have both diagnostic and prognostic value, and are related to a more aggressive joint disease in RA. However, a single biomarker cannot differentiate RA subtypes, so simultaneous analysis of the target citrullinated peptides, incorporated into a multiplex test, would facilitate the biological fingerprinting of autoantibodies in serum that would allow us to identify subgroups of patients with specific clinical characteristics. These may include different prognoses; and those who either respond well to, or suffer negative effects from, certain therapeutic interventions.

Within this context, in previous work we already mapped the epitope anti-citrullinated fibrin and vimentin antibody responses using synthetic peptides obtained by solid-phase peptide synthesis, with the aim of improving the balance between sensitivity and specificity. The peptides selected were covalently combined to render several chimeric peptides bearing fibrin, vimentin and filaggrin domains [6,7]. We have demonstrated that the presence of different peptide sequences within the same molecule can result in synergistic effects compared to the monomeric peptides or the corresponding physical mixture of them [6,8,9]. Our previous results have shown that there are potential applications of RA diagnostic systems based on chimeric peptides composed of several citrullinated domains of human proteins. Moreover, those findings imply that more than one serological test that combine these target peptides in a single analysis is required to classify patients based on the presence or absence of ACPAs.

In this work, we now aim to analyze eight chimeric citrullinated peptides derived from different proteins present in rheumatoid synovial fluid simultaneously, incorporating them into a multiplex test. This will thereby allow us to explore the diagnostic value of the multiplex array compared to an ELISA-based commercial ACPA assay in a serum-saving way. These results could have far-reaching practical implications in the future for establishing whether the multiplex system adds power to current RA tests.

Materials and methods

The work was approved by the Ethics Committees of the *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC), Madrid, Spain, and of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. All methods were performed in accordance with the relevant IQAC-CSIC guidelines and regulations. Written consent was obtained from all participants and suitably informed.

Chimeric peptides

The eight chimeric peptides shown in Fig 1 were manually synthesized as C-terminal carboxamides in polypropylene syringes, each fitted with a polyethylene porous disk. 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-protected amino acids (3 equiv) and 2-(1H-7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate methanaminium (HATU) (3 equiv) were added sequentially to the resin in dimethylformamide (DMF) (3 mL) followed by diisopropylethylamine (DIPEA) (6 equiv).

The mixture was allowed to react, with intermittent manual stirring, for 30 min. The solvent was removed by filtration, and the resin was washed with DMF (5 × 30 s). The extent of coupling was checked by applying the Kaiser colorimetric assay or the De Clercq test. The Fmoc group was removed by treating the resin with 20% piperidine in DMF (3–4 mL/g resin,

CFFCP1 (fibrin-filaggrin)

HSTKRGHAKSRPV**Cit**G-HQCHQEST**Cit**GRSRGRRCGRSGS

CFFCP2 (fibrin-filaggrin)

HSTKRGHAKS**Cit**PV**Cit**G-HQCHQEST**Cit**GRSRGRRCGRSGS

CFFCP3 (fibrin-filaggrin)

HSTK**Cit**GHAKSRPV**Cit**G-HQCHQEST**Cit**GRSRGRRCGRSGS

CFECP (fibrin-enolase)

HSTKRGHAKSRPV**Cit**G-CKIHA**Cit**EIFDS**Cit**GNPTVEC

CFVCP (fibrin/vimentin)

HSTKRGHAKSRPV**Cit**G- STRSRLYACSPGGVYATRSCAVRL**Cit**S

CVECP (vimentin-enolase)

STRSRLYASSPGGVYATRSSAVRL**Cit**S-CKIHA**Cit**EIFDS**Cit**GNPTVEC

CEFCP (enolase-filaggrin)

KIHA**Cit**EIFDS**Cit**GNPTVE-HQCHQEST**Cit**GRSRGRRCGRSGS

CVFCP (vimentin/filaggrin)

STRSRLYASSPGGVYATRSSAVRL**Cit**S-HQCHQEST**Cit**GRSRGRRCGRSGS

Fig 1. Primary structure of chimeric citrullinated peptides derived from fibrin, filaggrin, vimentin and enolase proteins.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.g001>

2 × 10 min). Peptide elongation continued by coupling the second and subsequent amino acids using the same procedure. The peptides were cleaved from the resin by means of treatment with 95% trifluoroacetic acid (TFA) in the presence of scavengers: 2% H₂O, 2% 1,2-ethanedithiol (EDT) and 1% triisopropylsilane (TIS) for 3 h. In order to synthesize the cyclic chimeric peptide, 2 serine residues in the linear peptide were substituted for 2 cysteines. After peptide cleavage, the peptide was dissolved in acetic acid (AcOH)/H₂O (1:1, 3 mg/mL) under N₂, then HCl (1 M, 0.1 mL/mg) followed by I₂ (20 equiv/acetamidomethyl, AcM) were added to the solution. After 4 h, the I₂ was quenched by adding 1 M ascorbic acid drop-wise until the mixture became colorless and then it was concentrated by evaporation under reduced pressure to approximately one third of the original volume. The final product was purified by semipreparative HPLC in a Kromasil C-18 column (Tecknokroma, 5 μm, 25 × 1 cm) with a linear gradient of 100%-75% A in B over 30 min, at a flow rate of 4 mL/min, using 0.05% TFA in water (A) and 0.05% TFA in acetonitrile (B) as the eluting system. The purified chimeric peptides (purity greater than 95%) were characterized by analytical ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and electrospray ionization mass spectrometry (ES-MS).

Serum specimens

Patients who fulfilled revised ACR/EULAR 2010 criteria for the classification of RA were enrolled in this study. They were all outpatients attending the Rheumatology Unit of the Hospital Clinic in Barcelona. Serum samples used as negative controls were obtained from blood donors at the same hospital. Sera were previously tested in duplicate for the presence of anti-CCP3 (Immunoscan RA; Eurodiagnostica, distributed by Diasorin, Madrid, Spain) and anti-CFFCPs, anti-CVFCP and anti-CFVcCP as previously described [6, 7]. Patients with psoriatic arthritis (PsA) meeting CASPAR criteria [10] were included as an inflammatory control group.

ELISA assays

Peptide sequences were coupled covalently to ELISA microplates (Costar Corp., DNA-bind N-oxysuccinimide surface, Cambridge, MA, USA) as previously described [6, 7]. Briefly, the peptides were diluted to 10 μg/mL in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). Then, 100 μL of the peptide solution was added to each well of microplates and incubated overnight at 4°C. Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample in order to estimate the background reading, together with control wells that included all reagents except the peptide to evaluate non-specific serum reactions. For blank controls, wells were coupled with 2 μg BSA/well. After incubation, the plates were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) 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. Afterwards, 100 μL/well was added and incubated for 1.5 h at room temperature. After washing 6 times with phosphate-buffered saline (PBS)/0.05% Tween-20, we added 100 μL/well of anti-human IgG conjugated to peroxidase diluted 1:1000 in RIA buffer. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed 6 times with PBS/0.05% Tween-20 and bound antibodies were detected with o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.8 μL/mL 30% hydrogen peroxide. The plates were incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 50 μL of 2N H₂SO₄ per well and absorbance values were measured at a wavelength of 492 nm. All the sera were tested in duplicate. Control sera were also included to monitor inter- and intra-assay variations.

Microarray design

To perform microarray assays, the peptides were covalently immobilized (Miniarrayer BioOdissey™ Calligrapher™, BioRad, CA, USA) on the slides via epoxide groups. The immunoassay procedure was carried out as described previously [11]. A secondary antibody anti-human IgG labeled with Alexa Fluor 647 was used and the fluorescence of the spots was quantified in a scanner (ScanArray GX Plus, Perkin Elmer). The microarray assay was then optimized in two steps.

Firstly, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) for 1 h at room temperature. Afterwards, serum samples (diluted 1:50) were analyzed for the presence of ACPA-specific IgG working with three chimeric peptides (CFFCP1, CFFCP2 and CFFCP3) that were spotted in quintuplicate on: 1) glass slides coated with an epoxy group or 2) Super NHS microarray substrate slides (ArrayIt, CA, USA). After 1.5 h of incubation at room temperature in a humidity chamber, the slides were washed six times with PBS tween buffer and the anti-human IgG labeled with Alexa Fluor 647 (dilution 1:250) was added and incubated at room temperature for 1 h. Microarray fluorescence was read using excitation and emission wavelengths of 633 and 647 nm, respectively. The Scan Array GX Plus software calculates intensity homogeneity (as a coefficient of within individual spots and intra-spot variabilities) for all spots coated with the same peptide. In this first assay, the glass slides coated with epoxy groups yielded better results.

Secondly, the same procedure as indicated above was carried out but diluting the peptides in two types of buffer: 1) carbonate buffer pH 9.6 or 2) peptide printing buffer (ArrayIt, CA, USA). The three peptides were spotted in quintuplicate on glass slides coated with an epoxy group using 18 and 6 randomly selected RA and 6 BD samples respectively (24 was the maximum number of samples on a slide). Microarray slides spotted with peptides diluted in carbonate buffer showed better results than those in the commercial buffer. Consequently, the final microarray assay that we performed with all the chimeric peptides was carried out in this way. Nevertheless, in order to improve spot intensity, the peptides/serum incubation time was increased to 2 h and also a lower dilution of anti-human IgG labeled with Alexa Fluor 647 (1:100) was used. The eight chimeric peptides were spotted in triplicate in the final assay. At least two of the three spots should be accepted to obtain results. After this, sera that still rendered a high coefficient of variation (CV) were discarded.

Statistical analysis

Cut-off values for homemade ELISA tests were selected according to receiver operating characteristic (ROC) analysis, to give a specificity of 98% for RA versus healthy blood donors (BD). In order to evaluate the diagnostic properties of the different peptides, sensitivity, specificity and positive and negative predictive values (PPV and NPV) were calculated using the RA and BD cohorts. Quantitative data were reported as means, standard deviations, medians and interquartile ranges; absolute frequencies and percentages were used to describe qualitative data.

The association between microarray and ELISA values was analyzed using the nonparametric Spearman rank correlation coefficient due to the nonsymmetric distributions of the data. To compare percentages, the classical two-sample test of proportions was used. All p-values were two sided and the significance level was established at $\alpha = 0.05$. Comparison and analysis of ROC curves and all other statistical analysis was performed using STATA 15.0 statistical software [12].

Results and discussion

As previously reported [6,7], the identification of novel citrullinated antigens that could supplement or complement ACPA-based existing tests, is required. A challenging approach consists of analyzing ACPA profiles using multiple citrullinated peptide antigens simultaneously. In the present work, considering the increased antigenicity previously observed with multi-meric peptides bearing different epitope peptide sequences within the same molecule, we designed and synthesized three new chimeric peptides in the solid phase. They were composed of citrullinated peptides derived from filaggrin (cyclic filaggrin peptide, constituting the CCP1 test), fibrin (617–631), vimentin (47–72) and enolase (CEP-1), and herein we refer to them as chimeric fibrin/enolase citrullinated peptide (CFECP), chimeric vimentin/enolase citrullinated peptide (CVECP) and chimeric enolase/filaggrin citrullinated peptide (CEFCP). The analytical characterization of these three novel chimeric peptides using UPLC-MS is shown in the Supplementary material (Figs A, B and C in [S1 File](#)) and the primary structure of all the chimeric citrullinated peptides studied in the present work is shown in [Fig 1](#). Firstly, a comparative ELISA assay was performed in cohorts of 100 RA and 87 BD sera using CFECP, CVECP and CEFCP as coating antigens; as was previously performed with the chimeric peptides CFFCP1, CFFCP2, CFFCP3, CFVCP and CVFCP [6, 7]. The values of the area under the ROC curve (RA vs BD) are shown in [Fig 2](#): CEFCP: 0.78; CVECP: 0.71; CFECP: 0.78. Using cut-off values that yield a specificity of 98.85% with respect to BD, the sensitivity of the ELISAs was 63% for CEFCP, 37% for CVECP, and 56% for CFECP; with PPV > 97.4% in all three tests and NPV between 57.7% and 69.9%.

Our results indicate that these new chimeric citrullinated peptides derived from human proteins should be considered for inclusion in the design of a multiplex citrullinated peptide-based array for the diagnosis of RA. In order to identify the best conditions for performing the multiplex assays, optimization experiments were conducted as described in the Materials and methods section above. We analyzed the diagnostic value of a multiplex array containing the eight different citrullinated chimeric peptides and their arginine counterparts (to control for citrulline specificity), which had previously been validated using another panel of RA sera and the CFFCP antigens [11]. A subset of 70 healthy BDs from the cohort used for ELISA analysis was used to establish the cut-off for each of the chimeric peptide antigens tested. To control for specificity, we used a panel of 70 sera derived from patients affected by PsA, an inflammatory disease with a clinical presentation that can simulate that of RA. First of all, the intra-assay CV was calculated for all sample/peptide pairs. We clearly observed higher fluorescence intensity response units (RUs) for the pairs of RA/citrullinated peptides than for the other pairs studied (BD or PsA/citrullinated peptides or arginine control peptides, and RA/arginine control peptides). In agreement with this, low-level RU samples (BD and PsA) showed overall a higher CV than high-level RU samples (RA). We therefore decided to exclude from the study those sera where CV > 30% in low-level RU and those with CV > 25% in samples with high intensity ([Table A in S1 File](#)). At least two spots in a triplicate had to be accepted to obtain results. Several examples of a positive RA serum and negative sera (PsA and BD) are shown in [Fig 3](#).

The association between the measurements performed by microarray and ELISA was made using uncorrected values. Comparison of the fluorescence intensities with the corresponding optical density units yielded satisfactory Spearman's rank correlation coefficients (ρ_s): values between 0.70 and 0.83 ([Fig D in S1 File](#)). Moreover, the performance of each individual chimeric peptide in the multiplex system was compared with its performance in the ELISA assay. As shown in the ROC curves obtained ([Fig E in S1 File](#)), at a level of specificity of 98%, the individual chimeric peptides showed marked differences in sensitivity which also depended on

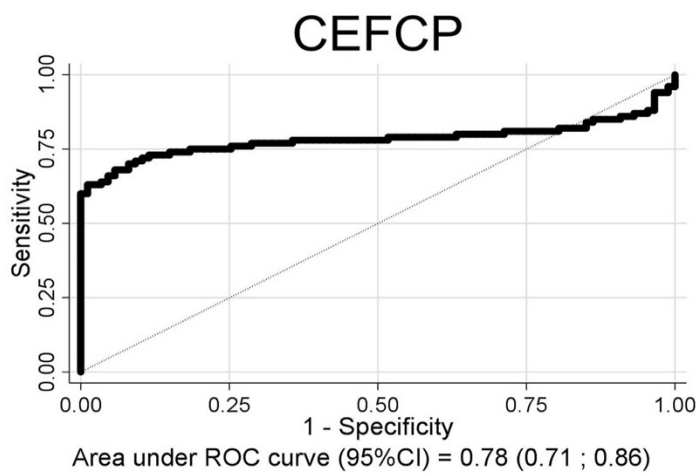
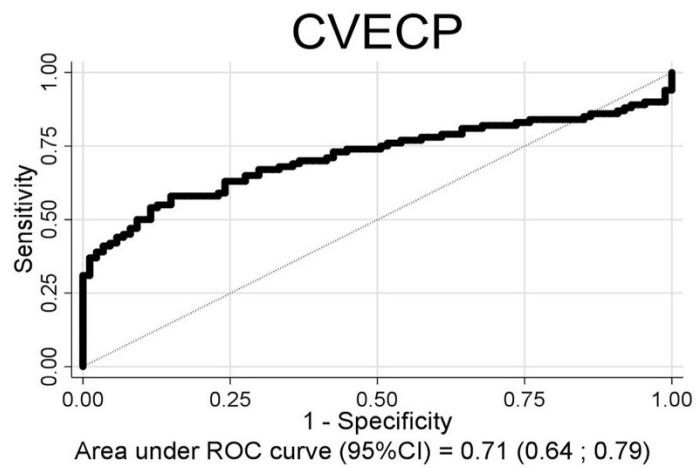
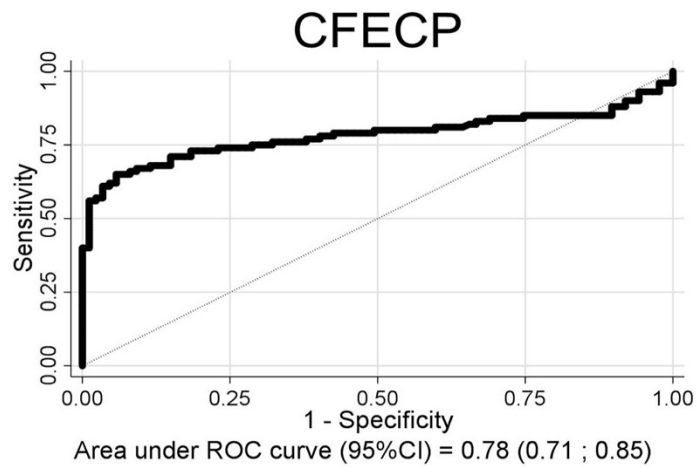


Fig 2. ROC curve analysis from ELISA results with chimeric fibrin-filaggrin-vimentin-enolase citrullinated peptides (CEFCP, CVECP and CFVCP) in the cohort of patients with RA (n = 100) and of blood donors (n = 87).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.g002>

whether the arginine control peptides were subtracted. In general, this correction improved the sensitivity of the corresponding assay (increased the number of RA subjects that were positive), with the only exception of CFVCP, where the number of positive sera decreased (sensitivity values decreased from 36.8% to 30.0%). For CFVCP and CEFCP, the effect of subtraction of citrulline control reactivity was null and did not affect the corresponding sensitivity values (Table 1). So, we decided to work with corrected values to measure the sensitivity of the eight chimeric citrullinated peptides in the multiplex array.

Table B in S1 File shows the individual reactivity of each citrullinated chimeric peptide for the RA, healthy BD and PsA cohorts. The results indicate that PsA patients and BD controls behave similarly, and clearly demonstrate very low reactivity compared to RA patients. To compare results of the combination of the eight chimeric citrullinated peptides (patterns) and the CCP3 commercial test for the RA cohort, a linear regression model was fitted (Fig 4).

The model was statistically significant ($p = 0.0025$) and the coefficient of determination (R-squared) indicates that 75.67% of the variability in CCP3 values is explained by the number of positive citrullinated peptides. Table 1 shows the individual performance of the eight chimeric citrullinated peptides included in the study, in comparison with the commercial CCP3 test, in the RA cohort. As shown in Table 2, three of these peptide sequences behaved significantly discordantly with the commercial test (CFFCP1, CFFCP2 and CFVCP).

Consequently, next we analyzed how the multiplex system works in comparison to CCP3, with regard to the peptides we considered for inclusion in the array. Firstly, the analysis was carried with all the (eight) peptides and considering multiplex positive to be when three or more peptides were positive. In this case, the following values were obtained: 76.4% sensitivity, 90.9% specificity. When the same analysis conditions were used, but excluding CFFCP1, CFFCP2 and CFVCP (five peptides were included in the analysis), the results were: 64.8% sensitivity, 90.9% specificity. Then, taking into account that CFFCP1 and CFFCP2 behave identically and although the pattern of citrullination in the primary structure of the three CFFCPs is different, they are composed of the same domains as filaggrin and fibrin proteins, we decided to perform the analysis excluding CFFCP1 and CFFCP2 and maintaining CFVCP. In this last case, the multiplex array contained six peptides and we considered it to be positive when three or more peptides were positive, the corresponding values of sensitivity and

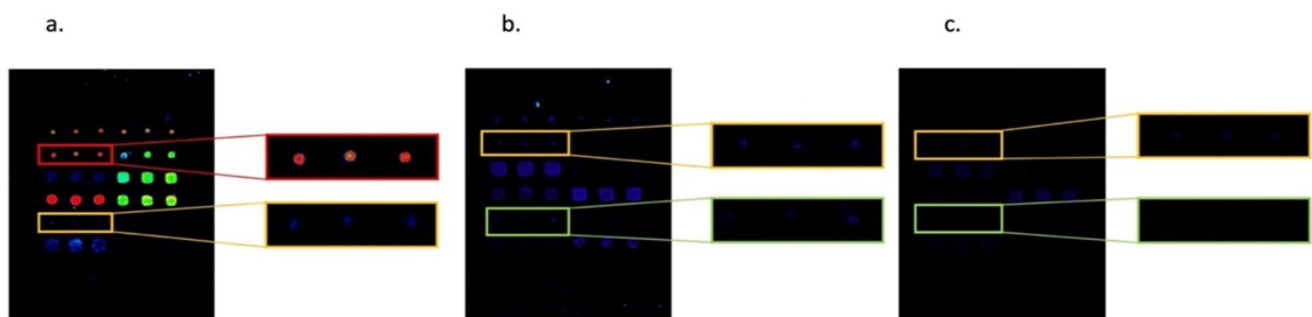


Fig 3. Graphic representation of the fluorescence intensities obtained from (a) an ACPA-positive RA serum, (b) an ACPA-negative control serum and (c) an ACPA-negative PsA serum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.g003>

Table 1. Performance of the eight citrullinated peptides studied and their comparison with the commercial ELISA-based CCP3 test.

Peptide	% of RA sera reacting at 98.0% specificity		% of the same RA sera reacting to CCP3		p
CFFCP1	20/34	(58.8%)	30/34	(88.2%)	0.006*
CFFCP2	23/34	(67.7%)	31/34	(91.2%)	0.016*
CFFCP3	35/44	(79.6%)	38/44	(86.4%)	0.395
CFECP	30/38	(79.0%)	33/38	(86.8%)	0.361
CFVCP	21/57	(36.8%)	49/57	(86.0%)	0.000*
CVECP	39/46	(84.8%)	39/46	(84.8%)	1.000
CEFCP	38/45	(84.4%)	40/45	(88.9%)	0.535
CVFCP	42/52	(80.8%)	44/52	(84.6%)	0.604

p: two-sample test of proportions p-value

* p < 0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.t001>

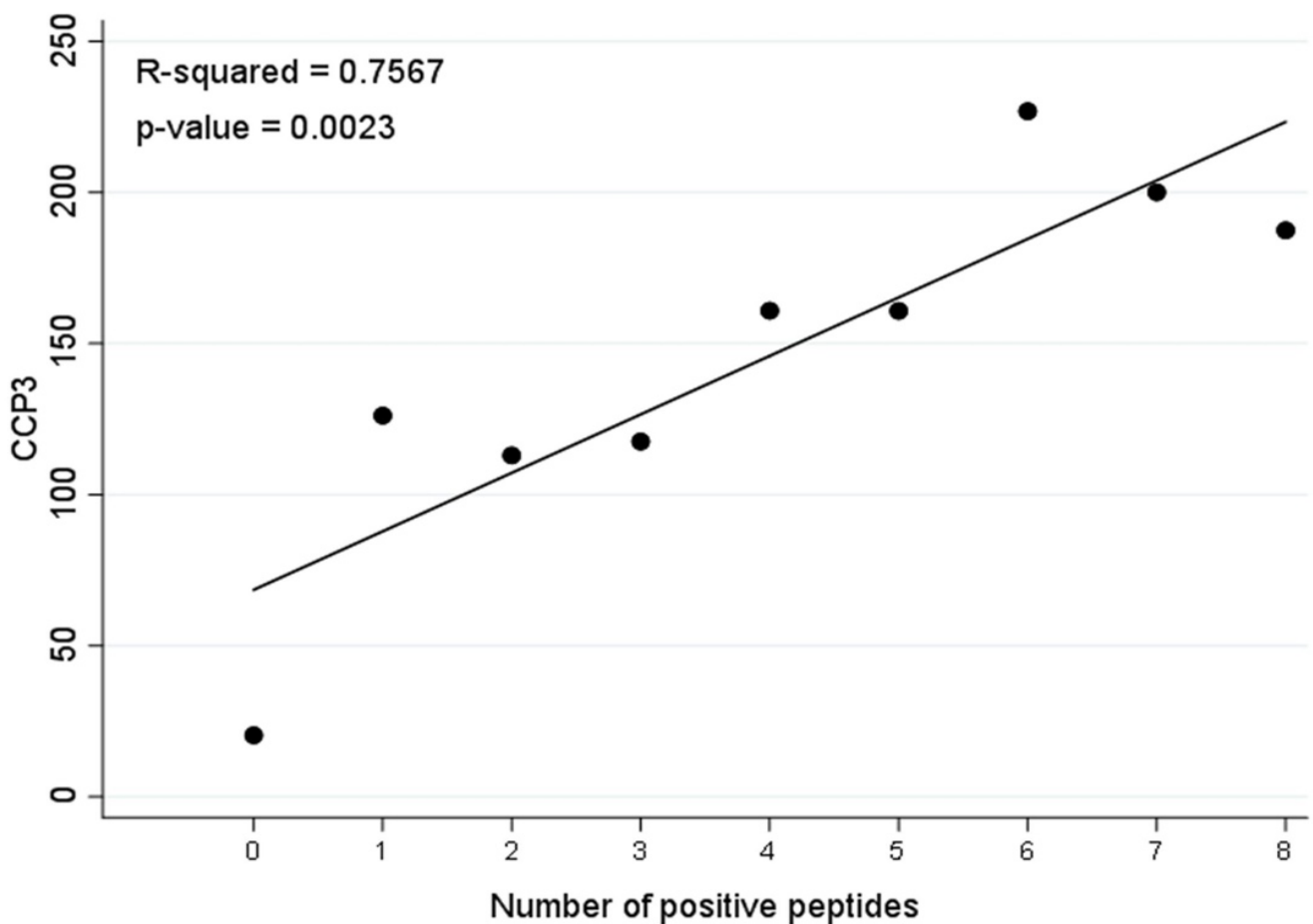


Fig 4. Association between mean CCP3 values and the number of positive citrullinated peptides in the multiplex system. Results of the fitted linear regression model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.g004>

Table 2. Sensitivity and specificity analysis of the multiplex assay compared to the commercial ELISA-based CCP3 test, regarding peptide biomarker selection.

Multiplex: all peptide biomarkers (8)							
	2+				3+		
CCP3	-	+		CCP3	-	+	
-	7	4	11	-	10	1	11
+	8	47	55	+	13	42	55
	15	51	66		23	43	66
Sensitivity		85,50%		Sensitivity		76,40%	
Specificity		63,60%		Specificity		90,90%	
Multiplex: 5 peptide biomarkers ^a							
	2+				3+		
CCP3	-	+		CCP3	-	+	
-	8	3	11	-	10	1	11
+	11	43	54	+	19	35	54
	19	46	65		29	36	65
Sensitivity		79,60%		Sensitivity		64,80%	
Specificity		72,70%		Specificity		90,90%	
Multiplex: 6 peptide biomarkers ^b							
	2+				3+		
CCP3	-	+		CCP3	-	+	
-	8	3	11	-	10	1	11
+	10	44	54	+	15	39	54
	18	47	65		25	40	65
Sensitivity		81,50%		Sensitivity		72,20%	
Specificity		72,70%		Specificity		90,90%	

CCP3: < 20 = - vs ≥ 20 = +

^a CFFCP1, CFFCP2 and CFVCP excluded

^b CFFCP1 and CFFCP2 excluded.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.t002>

specificity were: 72.2% and 90.9%, respectively. Finally and similarly to what is previously reported in the literature [13, 14] when array positivity is defined as being positive for more than two or more than one peptide, results were poorly RA-specific. This confirms the importance of critical selection of citrullinated peptides. In view of all these results, summarized in Table 2, we performed the subsequent analysis using the whole panel of eight peptides, as shown in Fig 1.

Fig 5 shows the relative frequency of ACPA positives in the three cohorts (RA and PsA patients; and healthy BD) for the combination of the eight chimeric peptide antigens. As shown, the proportion of RA patients that were positive to 3 or more peptides was 61.4%; while the healthy BD and PsA cohorts showed 0% of these 3-fold ACPA positives.

When array positivity was defined as more than one chimeric peptide antigen being positive, positivity in the RA cohort was 81.4%; while in the two control cohorts, it was 7.1% and 8.6% for BDs and PsA patients respectively. These results demonstrate sensitivity values comparable to those reported by others [15, 16]; while we observed 100% specificity for RA diagnosis when positivity was considered with 3 or more peptides being positive. When comparing with the commercial CCP3 test, discordant results were obtained in 21% of the RA sera studied (13 of 66 were CCP3 positive and multiplex negative; and 1 of 66 resulted CCP3 negative and multiplex positive). These findings reflect the differences that exist in the peptide repertoire in the two platforms and reinforce both the broad heterogeneity of ACPAs and the increasing

Patterns of reactivities

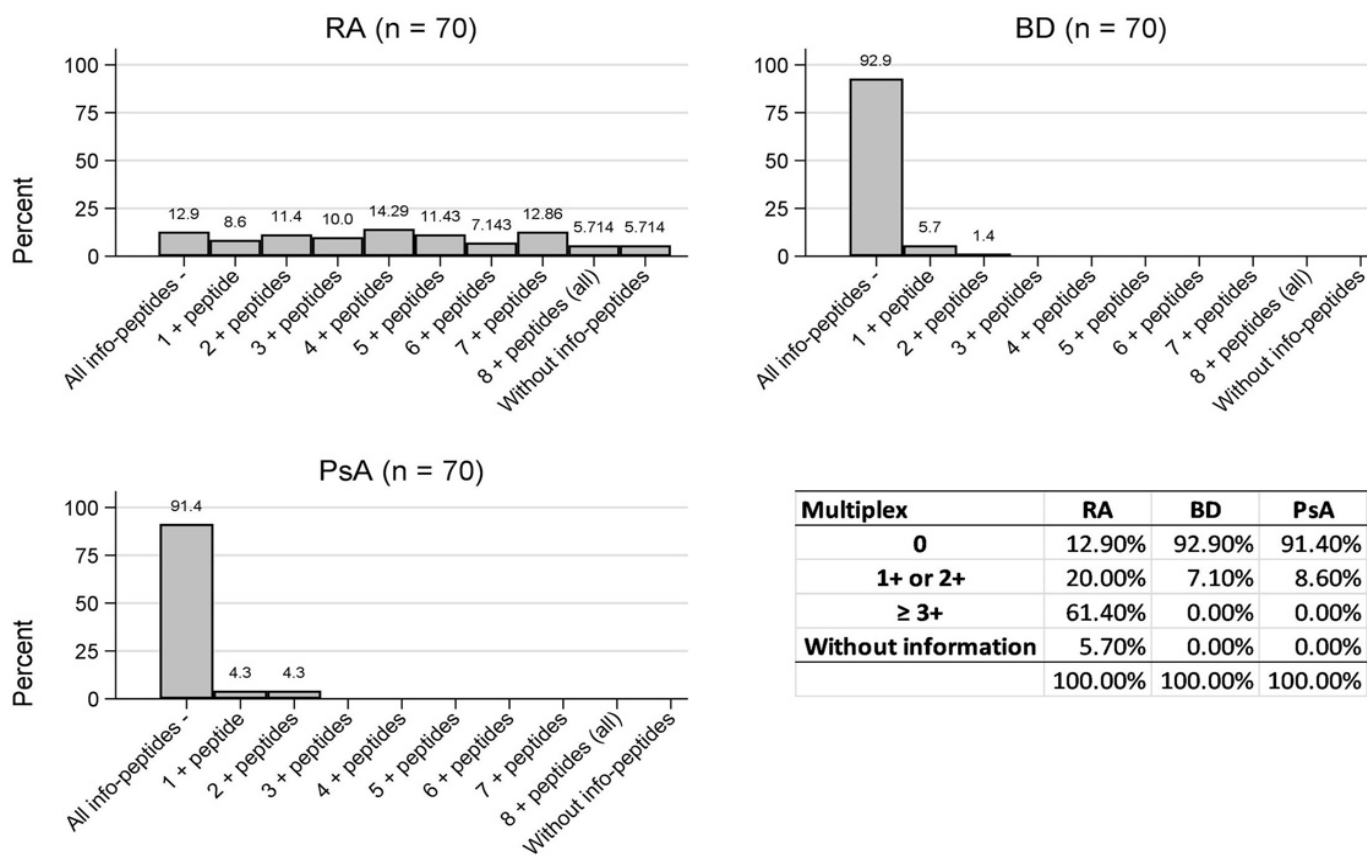


Fig 5. Patterns of reactivities of the eight citrulline peptides in RA patients, healthy BDs and PsA patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215927.g005>

number of citrullinated proteins or peptides that present different reactivity patterns with RA sera [17]. Moreover, a great number of studies have reported non-specific responses of commercial RA tests [18–20] due to the fact that they never routinely perform a parallel control with the peptides containing native arginine, instead of citrulline. However, our multiplex array easily allows us to perform this control and thus the results reported here for ACPA reactivity are strictly citrulline specific.

Conclusions

Here, we have develop a novel multiplex platform composed of eight chimeric citrullinated peptides derived from human proteins that abound in rheumatoid synovial, and we have evaluated its suitability to detect anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs) in serum samples of rheumatoid arthritis (RA) and psoriatic arthritis (PsA) patients, as well as in healthy blood donors. Our results demonstrate that the platform has a high specificity for ACPA detection, especially taking into account that the control group consisted of patients affected by

PsA, an inflammatory disease whose clinical presentation can simulate that of RA. When comparing with the commercial ELISA-based test (CCP3), it is true that ACPA reactivity was only detected by the multiplex array in one CCP3-negative RA serum sample. However, this in-house multiplex system allowed us to control for background reactivity to arginine and worked in a serum-saving way, compared to CCP3. In conclusion, a highly citrulline-specific multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides derived from filaggrin, fibrin, vimentin and human enolase proteins for the detection of ACPAs has been developed herein. In order to improve sensitivity and expand future use in RA diagnosis, peptides bearing other non-proteogenic amino acids could be designed, synthesized and incorporated into the platform as novel antigenic substrates for further development of the multiplex system.

Supporting information

S1 File. UPLC-MS characterization of CFECF (Fig A), CEFCEP (Fig B) and CVECF (Fig C). Relationship between fluorescence intensities (microarray) (RU) and the corresponding optical density units (ELISA) (OD) for RA patients (Fig D). ROC curves analysis from microarray results (Fig E). Number of discarded sera in RA, BD and PsA cohorts (Table A). Reactivity of RA, BD and PsA cohorts to each citrullinated peptide (Table B). (DOCX)

Author Contributions

Conceptualization: Isabel Haro.

Data curation: María José Bleda.

Formal analysis: María José Gómara, María José Bleda.

Funding acquisition: Isabel Haro.

Investigation: María José Gómara, Raimon Sanmartí.

Methodology: Cristina García-Moreno.

Software: María José Bleda.

Supervision: Raimon Sanmartí, Isabel Haro.

Validation: Raimon Sanmartí.

Writing – original draft: Isabel Haro.

Writing – review & editing: Isabel Haro.

References

1. Klareskog L, Catrina A, Paget S. Rheumatoid Arthritis. *Lancet* 2009; 373: 659–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60008-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60008-8) PMID: 19157532
2. McInnes IB and Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2205–19. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965> PMID: 22150039
3. Trouw LA, Rispens T, Toes REM. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 331–9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.15> PMID: 28275265
4. 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: 645–55. <https://doi.org/10.1002/art.38969> PMID: 25417811
5. Gómara MJ and Haro I. Citrullinated peptides in the diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Curr Top Med Chem*, 2013; 13: 743–51. PMID: 23574523

6. Pérez ML, Gómara MJ, Ercilla G, Sanmartí R, Haro I. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis *J Med Chem* 2007; 50: 3573–84. <https://doi.org/10.1021/jm0701932> PMID: 17585853
7. Malakoutikhah M, Gómara MJ, Gómez-Puerta JA, Sanmartí R, Haro I. The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* 2011; 54: 7486–92. <https://doi.org/10.1021/jm200563u> PMID: 21981664
8. Pérez T, Ercilla G, Chan W, Haro I. Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on non-structural NS4 and NS5 proteins of GBV-C/HGV. *J Pep Sci*, 2006; 12: 267–78.
9. Gómara MJ, Riedemann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides to immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Met* 2000; 234: 23–34.
10. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H; CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study *Arthr. Rheum.* 2006, 54: 2665
11. Gómara MJ, Rodríguez J, Bleda MJ, Salvador JP, Sanmartí R, Haro I. 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(2): 285–93. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0264> PMID: 28850543
12. StataCorp. 2017. Stata: Release 15. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LLC
13. Wagner CA, Sokolove J, Lahey LJ, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Alfredsson L et al. Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 “shared epitope” alleles. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 579–86. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203915> PMID: 24297382
14. Van Heemst J, Trouw LA, Nogueira L, van Steenberg HW, van der Helm-van Mil AHM, Allaart CF et al. An investigation of the added value of an ACPA multiplex assay in an early rheumatoid arthritis setting. *Arthr Res Ther* 2015; 17: 276–86.
15. Hansson M, Mathsson L, Schleder T, Israelsson L, Matsson P, Nogueira L et al. Validation of a multiplex chip-based assay for the detection of autoantibodies against citrullinated peptides. *Arthr Res Ther* 2012; 14: R201
16. Rönnelid J, Hansson M, Mathsson-Alm L, Cornillet M, Reed E, Jakobsson PJ et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPA-positive rheumatoid arthritis patients with distinct genetic and environmental determinants. *Ann Rheum Dis* 2017; <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211782> PMID: 29070529
17. Uysal H, Nandakumar KS, Kessel C et al. Antibodies to citrullinated proteins molecular interactions and arthritogenicity. *Immunol Rev* 2010; 233: 9–33. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00853.x> PMID: 20192990
18. Kakumanu P, Yamagata H, Sobel ES, et al. Patients with pulmonary tuberculosis are frequently positive for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, but their sera also react with unmodified arginine-containing peptide. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1576–81. <https://doi.org/10.1002/art.23514> PMID: 18512773
19. Vannini A, Cheung K, Fusconi M, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide positivity in non-rheumatoid arthritis disease samples: citrulline-dependent or not? *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 511–6. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.058933> PMID: 16984940
20. Ahlin E, Elshafie AI, Nur MA, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies in Sudanese patients with Leishmania donovani infection exhibit reactivity not dependent on citrullination. *Scan J Immunol* 2015; 81: 201–8.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

**A MULTIPLEX ASSAY BASED ON CHIMERIC CITRULLINATED PEPTIDES FOR THE
DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS**

Cristina García-Moreno, María José Gómara, María José Bleda, Raimon Sanmartí and Isabel Haro

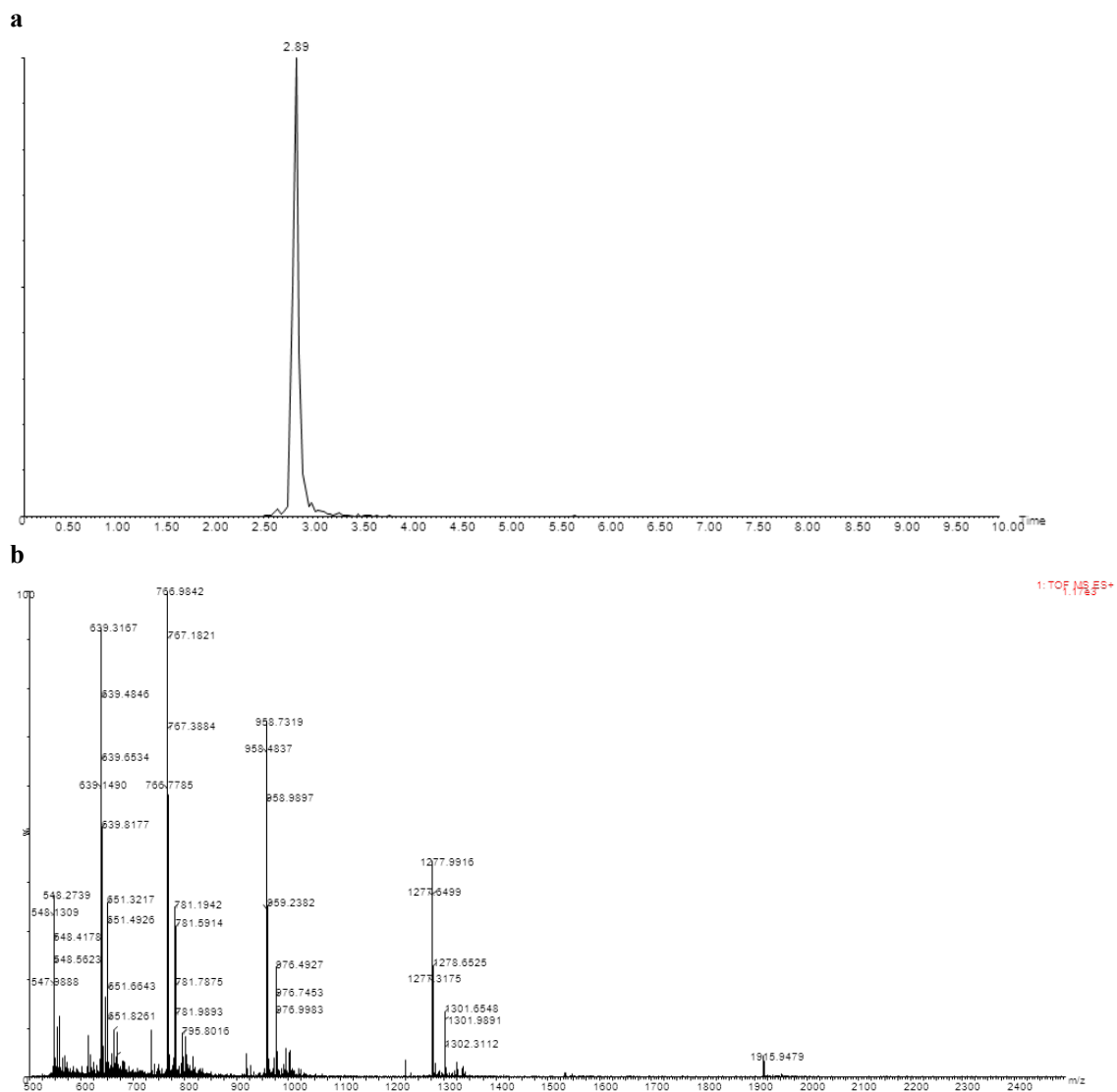


Figure A. UPLC-MS characterization of CFCEP. (a) Peptide Elution was performed on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×100 mm, 1.7 μm) with a linear gradient of 5%-100% solvent B (20mM formic acid in ACN) into solvent A (20mM formic acid in water) over 10min at 0.3mL/min. (b) The mass spectrum was recorded in positive ion mode in the m/z 500-2500 range. Calculated m/z: $[M+2H]^{+2}=1915.46$, $[M+3H]^{+3}=1277.31$, $[M+4H]^{+4}=958.24$, $[M+5H]^{+5}=766.79$, $[M+6H]^{+6}=639.16$, $[M+7H]^{+7}=547.99$; experimental m/z: $[M+2H]^{+2}=1915.95$, $[M+3H]^{+3}=1277.31$, $[M+4H]^{+4}=958.48$, $[M+5H]^{+5}=766.77$, $[M+6H]^{+6}=639.15$, $[M+7H]^{+7}=547.99$

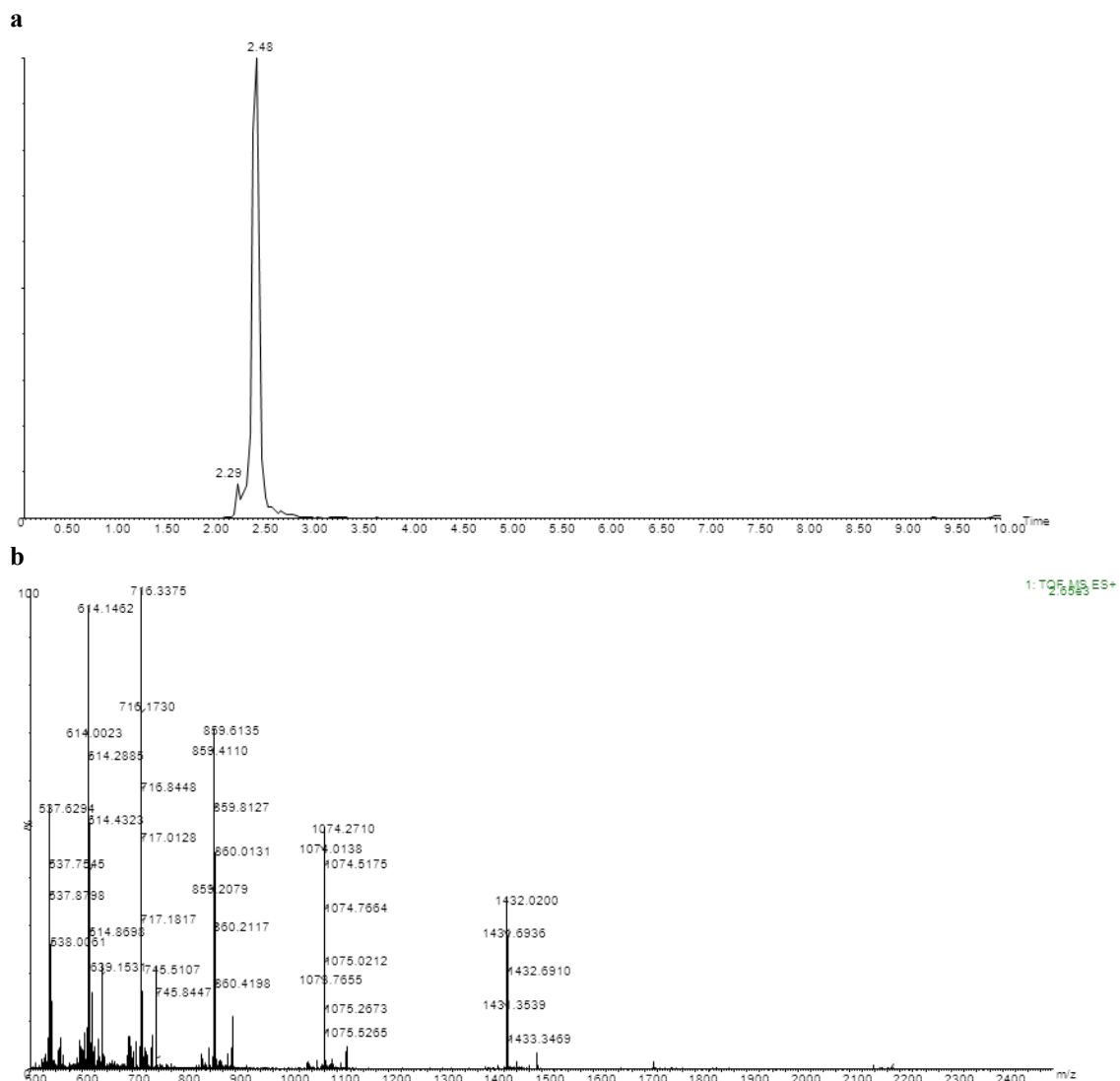


Figure B. UPLC-MS characterization of CEFCP. (a) Peptide Elution was performed on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×100 mm, 1.7 μm) with a linear gradient of 5%-100% solvent B (20mM formic acid in ACN) into solvent A (20mM formic acid in water) over 10min at 0.3mL/min. (b) The mass spectrum was recorded in positive ion mode in the m/z 500-2500 range. Calculated m/z: $[M+3H]^{+3}=1431.02$, $[M+4H]^{+4}=1073.51$, $[M+5H]^{+5}=859.01$; $[M+6H]^{+6}=716.01$, $[M+7H]^{+7}=613.87$, $[M+8H]^{+8}=537.26$; experimental m/z: $[M+3H]^{+3}=1431.35$, $[M+4H]^{+4}=1073.76$, $[M+5H]^{+5}=859.20$; $[M+6H]^{+6}=716.17$, $[M+7H]^{+7}=614.00$, $[M+8H]^{+8}=537.62$

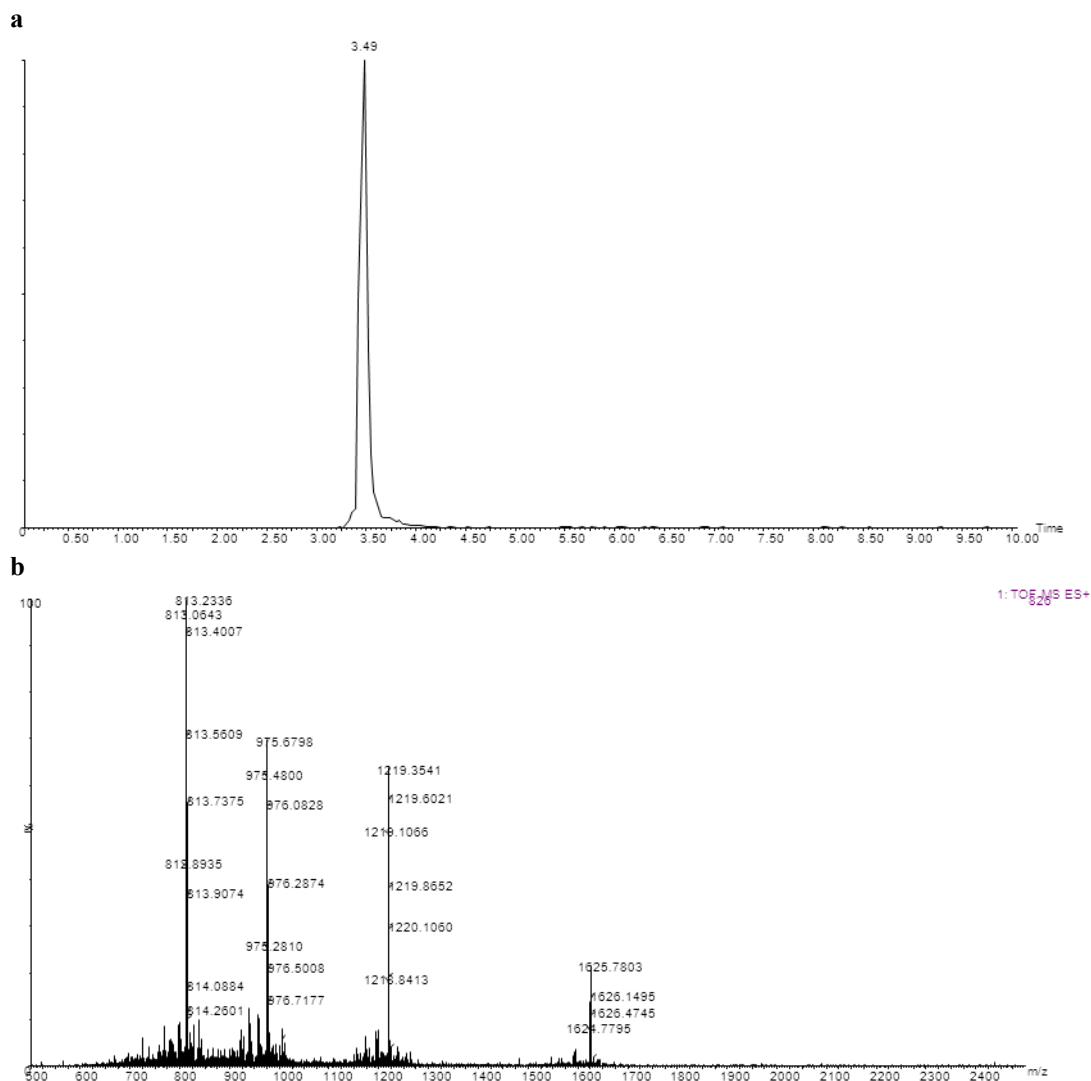


Figure C. UPLC-MS characterization of CVECP. (a) Peptide Elution was performed on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×100 mm, 1.7 μm) with a linear gradient of 5%-100% solvent B (20mM formic acid in ACN) into solvent A (20mM formic acid in water) over 10min at 0.3mL/min. (b) The mass spectrum was recorded in positive ion mode in the m/z 500-2500 range. Calculated m/z: [M+3H]⁺³=1625.14, [M+4H]⁺⁴=1219.11, [M+5H]⁺⁵=975.49; [M+6H]⁺⁶=813.07; experimental m/z: [M+3H]⁺³=1624.78, [M+4H]⁺⁴=1218.84, [M+5H]⁺⁵=975.28; [M+6H]⁺⁶=812.89

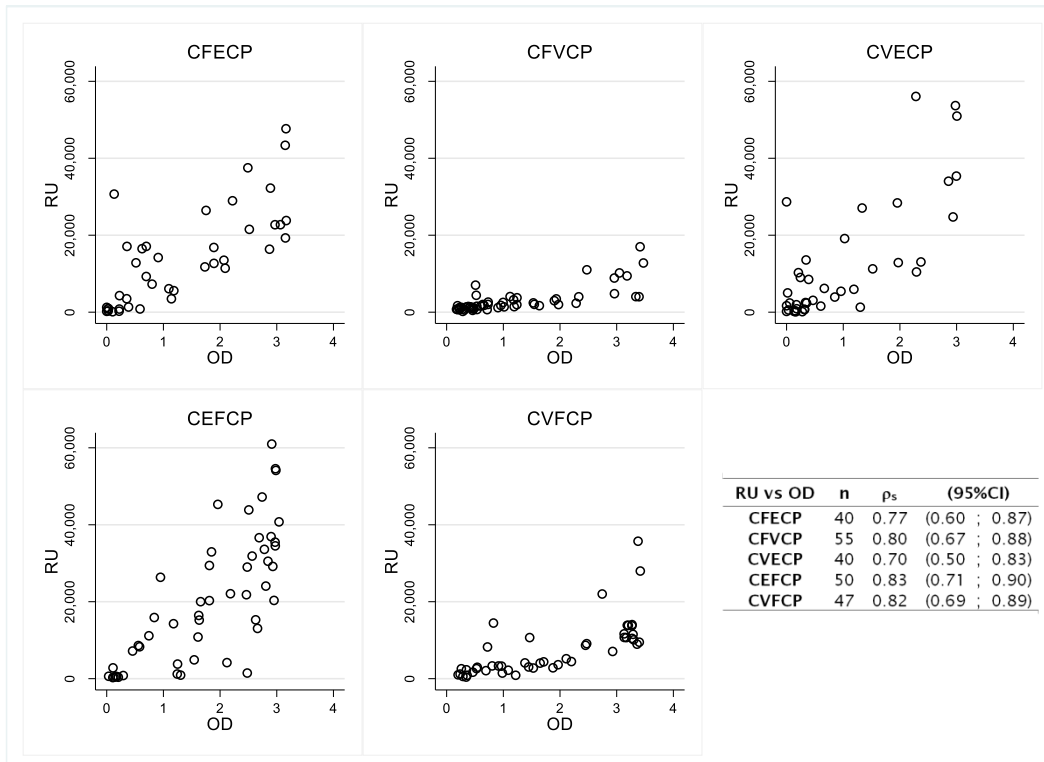


Figure D. Relationship between fluorescence intensities (microarray) (RU) and the corresponding optical density units (ELISA) (OD) for RA patients (n). Two-way graphs and Spearman's rank correlation coefficients (ρ_s) with their 95% confidence interval (95%CI).

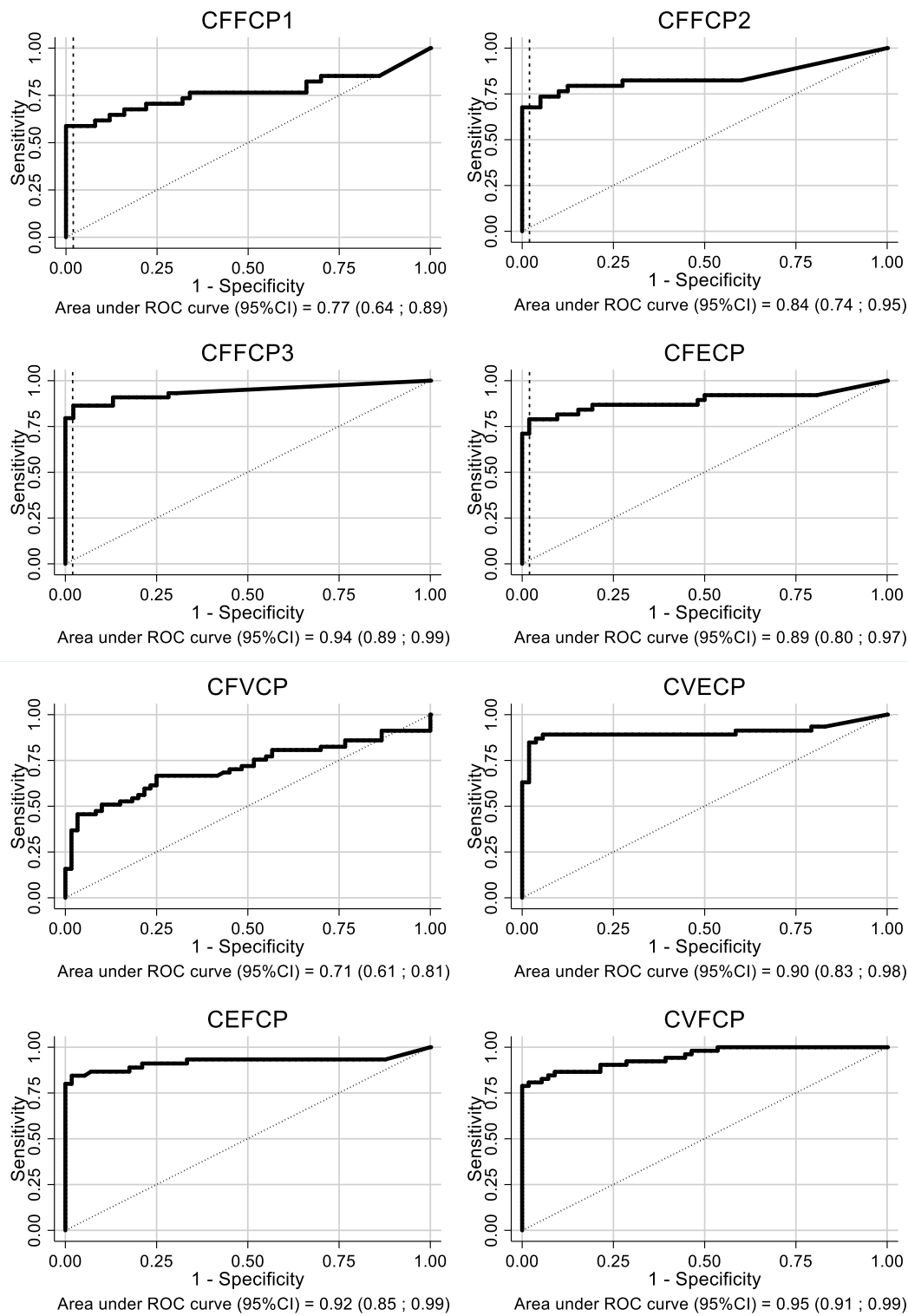


Figure E. ROC curves analysis from microarray results with chimeric fibrin-filaggrin citrullinated peptides (CFFCP1, CFFCP2, CFFCP3), chimeric vimentin-filaggrin citrullinated peptide (CVFCP), chimeric fibrin-vimentin citrullinated peptide (CFVCP), chimeric enolase-filaggrin citrullinated peptide (CEFCP), chimeric vimentin-enolase citrullinated peptide (CVECP) and chimeric fibrin-enolase citrullinated peptide (CFECP) in the RA and BD cohorts of patients.

Table A. Number of discarded sera in RA, BD and PsA cohorts due to a high variability in the fluorescence intensity response units of corresponding triplicates spots for citrullinated and control peptides.

RA (n = 70)								
	Discarded sera CV > 25%		Control peptide	Discarded sera CV > 30%		Discarded pairs Peptide or Control CV > 25%,30%		Final pairs
CFFCP1	20	(28.57%)	CFFCP-R	21	(30.00%)	36	(51.43%)	34
CFFCP2	21	(30.00%)	CFFCP-R	21	(30.00%)	36	(51.43%)	34
CFFCP3	10	(14.29%)	CFFCP-R	21	(30.00%)	26	(37.14%)	44
CFECP	16	(22.86%)	CFECP-R	21	(30.00%)	32	(45.71%)	38
CFVCP	0	(0.00%)	CFVCP-R	13	(18.57%)	13	(18.57%)	57
CVECP	15	(21.43%)	CVECP-R	13	(18.57%)	24	(34.29%)	46
CEFCP	6	(8.57%)	CEFCP-R	21	(30.00%)	25	(35.71%)	45
CVFCP	8	(11.43%)	CVFCP-R	13	(18.57%)	18	(25.71%)	52
BD (n = 70)								
	Discarded sera CV > 30%		Control peptide	Discarded sera CV > 30%		Discarded pairs Peptide or Control CV > 30%		Final pairs
CFFCP1	7	(10.00%)	CFFCP-R	14	(20.00%)	20	(28.57%)	50
CFFCP2	20	(28.57%)	CFFCP-R	14	(20.00%)	30	(42.86%)	40
CFFCP3	14	(20.00%)	CFFCP-R	14	(20.00%)	24	(34.29%)	46
CFECP	10	(14.29%)	CFECP-R	11	(15.71%)	18	(25.71%)	52
CFVCP	3	(4.29%)	CFVCP-R	7	(10.00%)	10	(14.29%)	60
CVECP	13	(18.57%)	CVECP-R	7	(10.00%)	17	(24.29%)	53
CEFCP	3	(4.29%)	CEFCP-R	11	(15.71%)	13	(18.57%)	57
CVFCP	8	(11.43%)	CVFCP-R	7	(10.00%)	14	(20.00%)	56
PsA (n = 70)								
	Discarded sera CV > 30%		Control peptide	Discarded sera CV > 30%		Discarded pairs Peptide or Control CV > 30%		Final pairs
CFFCP1	9	(12.86%)	CFFCP-R	3	(4.29%)	12	(17.14%)	58
CFFCP2	29	(41.43%)	CFFCP-R	3	(4.29%)	32	(45.71%)	38
CFFCP3	11	(15.71%)	CFFCP-R	3	(4.29%)	14	(20.00%)	56
CFECP	8	(11.43%)	CFECP-R	14	(20.00%)	18	(25.71%)	52
CFVCP	1	(1.43%)	CFVCP-R	6	(8.57%)	7	(10.00%)	63
CVECP	10	(14.29%)	CVECP-R	6	(8.57%)	15	(21.43%)	55
CEFCP	3	(4.29%)	CEFCP-R	14	(20.00%)	17	(24.29%)	53
CVFCP	7	(10.00%)	CVFCP-R	6	(8.57%)	13	(18.57%)	57

Table B. Reactivity of RA, BD and PsA cohorts to each citrullinated peptide.

	RA			BD			PsA		
	Number of sera reacting	Number of positive	(%)	Number of sera reacting	Number of positive	(%)	Number of sera reacting	Number of positive	(%)
CFFCP1	34	20	(58.8)	50	1	(2.0)	58	0	(0.0)
CFFCP2	34	23	(67.7)	40	0	(0.0)	38	1	(2.6)
CFFCP3	44	35	(79.6)	46	0	(0.0)	56	0	(0.0)
CFECP	38	30	(80.0)	52	1	(1.9)	52	5	(9.6)
CFVCP	57	21	(36.8)	60	1	(1.7)	63	0	(0.0)
CVECP	46	39	(84.8)	53	1	(1.9)	55	3	(5.5)
CEFCP	45	38	(84.4)	57	1	(1.8)	53	0	(0.0)
CVFCP	52	42	(80.8)	56	1	(1.8)	57	0	(0.0)

Article 2



Article

Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Severe Rheumatoid Arthritis Patients

Cristina García-Moreno ¹, María J. Gómara ¹, Raúl Castellanos-Moreira ², Raimon Sanmartí ² and Isabel Haro ^{1,*}

¹ Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain; cristina.garcia@iqac.csic.es (C.G.-M.); mariajose.gomara@iqac.csic.es (M.J.G.)

² Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; doctor.castellanos.moreira@gmail.com (R.C.-M.); sanmarti@clinic.cat (R.S.)

* Correspondence: isabel.haro@iqac.csic.es



Citation: García-Moreno, C.; Gómara, M.J.; Castellanos-Moreira, R.; Sanmartí, R.; Haro, I. Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Severe Rheumatoid Arthritis Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13290. <https://doi.org/10.3390/ijms222413290>

Academic Editor: Macarena Sánchez-Navarro

Received: 10 November 2021

Accepted: 7 December 2021

Published: 10 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by the presence of autoantibodies that are of paramount importance for the diagnosis and prognosis of the disease and have been implicated in its pathogenesis. Proteins resulting from post-translational modifications (PTMs) are capable of triggering autoimmune responses important for the development of RA. In this work, we investigate serum antibody reactivity in patients with an established RA against a panel of chimeric peptides derived from fibrin and filaggrin proteins and bearing from one to three PTMs (citruination, carbamylation and acetylation) by home-designed ELISA tests (anti-AMPA autoantibodies). The role of anti-AMPAs as biomarkers linked to the presence of a more severe RA phenotype (erosive disease with radiological structural damage) and to the presence of interstitial lung disease (ILD), a severe extra-articular manifestation in RA patients entailing a high mortality, was also analyzed. In general, the association with the clinical phenotype of RA was confirmed with the different autoantibodies, and especially for IgA and IgM isotypes. The prevalence of severe joint damage was only statistically significant for the IgG isotype when working with the peptide bearing three PTMs. Furthermore, the median titers were significantly higher in patients with RA-ILD, a finding not observed for the IgG isotype when working with the single- and double-modified peptides.

Keywords: rheumatoid arthritis; erosive disease; interstitial lung disease; post-translational modifications; synthetic peptides; chimeric peptides; autoantibodies; ELISA

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune rheumatic disease of unknown etiology that affects 0.5–1% of adults worldwide, with women being three times more susceptible than men. It causes joint destruction and deformities, together with functional disability and reduced quality of life and life expectancy. RA is characterized by the presence of autoantibodies that are of paramount importance for the diagnosis and prognosis of the disease and have been implicated in its pathogenesis. In recent years, significant advances in the diagnosis and management of RA have changed the prognosis and outcome of RA for a significant proportion of patients [1–3].

The pathogenesis of RA has not been completely elucidated; however, when a breakdown of tolerance is produced, proteins resulting from post-translational modifications (PTMs) are capable of triggering autoimmune responses, which eventually occur in individuals genetically predisposed to suffer from RA [4]. Citruination is the best-studied PTM in rheumatology, and for a long time anti-citruinated protein/peptide antibodies (ACPAs) have been considered the most relevant serological markers in RA, becoming a hallmark of the disease. More recently, other PTMs in proteins have been described in RA, specifically homocitruination (carbamylation) and acetylation, in which the modification

does not take place in arginine (target of citrullination) but in lysine. In general terms, all autoantibodies found in RA are known as the anti-modified protein/peptide antibodies (AMPAs) family (Figure 1).

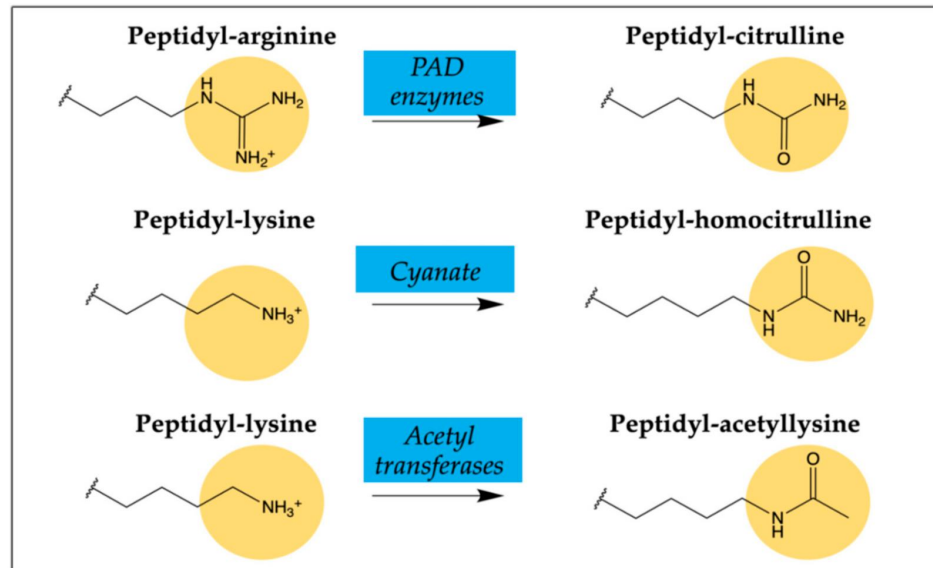


Figure 1. Schematics of post-translational peptide/protein modifications on arginine and lysine residues triggering AMPAs in RA patients.

Citrullination that consists of the conversion of arginine to the non-essential amino acid citrulline is mediated by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD2 and PAD4 isoforms which are found in the inflamed synovium). PAD hydrolyzes arginine's imino groups, thus reducing the net charge of the proteins through the loss of one positive charge per modified arginine residue. This deimination process causes protein unfolding and alters intra- and inter-molecular interactions [5]. An increasing number of citrullinated proteins/peptides that present different reactivity patterns with RA patients' sera have been reported, thus indicating that the induction of an ACPA response is caused by more than one single citrullinated epitope. Citrullinated fibrin has been considered one of the most relevant autoantigens in the synovial tissue of RA patients [6]. According to the literature, about 70–80% of RA patients are ACPA-positive [7].

Homocitrullination or carbamylation is a non-enzymatic PTM that involves the conversion of lysine residues to homocitrullinated residues after the reaction with cyanate. The level of cyanate is in equilibrium with urea and can be increased in RA patients [8]. Compared to ACPAs, antibodies against homocitrullinated (carbamylated) peptides/proteins known as anti-CarP antibodies have lower sensitivity and similar specificity. Anti-CarPs have been detected in about 45% of RA patients and they were also found in 10–20% of patients previously considered ACPA-negative [9]. Despite cross-reactivity with other antibodies, anti-CarPs have been shown to be independently associated with worse disease outcomes and complications [9,10].

Acetylation is a reversible enzymatic process (balance between acetylases and deacetylases) where acetyl groups are added to free amines of lysine residues to maintain appropriate acetylation for normal cell function. In 2015, Thiele et al. reported the existence of antibodies against acetylated proteins (anti-APA) [11], providing evidence of a third PTM with potential clinical and mechanistic importance in RA. Later, a link between microbiome, self-antigen acetylation and autoimmunity with potential relevance for RA was described [12].

On the other hand, synthetic peptides can advantageously replace proteins in solid-phase assays, and they have been widely used for specific autoantibody recognition related

to the diagnosis of autoimmune diseases [13–15]. Particularly, synthetic peptides are unambiguously defined chemical molecules whose chemical structure can mimic segments of complex protein antigens involved in autoantibody binding. Of note, enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assays based on cyclic citrullinated peptides were developed and are still considered the gold standard of ACPA testing today.

With the aim of designing novel ACPA tests useful as RA diagnostic tools, we previously designed and obtained by means of solid-phase peptide synthesis (SPPS) several chimeric citrullinated peptides derived from different proteins present in the rheumatoid synovial fluid bearing fibrin, vimentin, enolase and filaggrin domains [16–18]. After studying a large series of patients with various rheumatic conditions together with healthy controls, we concluded that anti-chimeric α -fibrin-filaggrin citrullinated peptide antibodies (anti-CFFCP) have a comparable sensitivity and specificity for RA compared to the gold standard commercial CCP2 test, and specifically, the CFFCP1 peptide ([Cit⁶³⁰] α fibrin(617-631)-S³⁰⁶,S³¹⁹cyclo [Cys^{306,319}, Cit³¹²]filaggrin(304-324)) yielded better results in terms of identifying patients with poor radiographic outcomes [19].

With this in mind, and also considering that the overlapping between the three families of autoantibodies (ACPAs, anti-Carp and anti-APA) is characteristic of RA in comparison with other rheumatic diseases, in the present work, we pursued obtaining novel chimeric peptide antigens focusing on the three PTMs described above and analyzing the diagnostic and prognostic value of the corresponding AMPAs home-designed tests based on these peptides. Specifically, we aimed to study the role of these anti-AMPA autoantibodies as biomarkers linked to the presence of interstitial lung disease (ILD), a severe extra-articular manifestation in RA patients entailing a high mortality [20]. The management of RA-ILD patients is challenging due to the heterogeneity in disease behavior [21]; therefore, an early diagnosis is crucial to establish the appropriate treatment strategy.

Recently, we described for the first time that anti-carbamylated protein antibodies that recognize homocitrullinated peptides were strongly associated with ILD, and suggested the possible link between homocitrullination and the development of ILD in RA patients [22]. Here, we describe novel peptide-based antigens bearing citrulline, homocitrulline and/or acetyl-lysine, and the analysis of the association between the different anti-peptide antibodies and the severity of arthritis (joint destruction) or extra-articular involvement (interstitial lung disease).

2. Results

2.1. Selection of the Home-Designed ELISA Methodology

The cyclic chimeric peptide CFFCP1 that yielded better results in terms of sensitivity/specificity balance and identified patients with poor radiographic outcomes as an antigen [19] was compared using two different binding strategies to the microtiter plates. Firstly, the peptide was directly covalently bound to ELISA plates following the ELISA methodology previously reported [19]. Alternatively, the CFFCP1 peptide was biotinylated at the N-terminal with N-Biotinyl-NH-(PEG)₂-COOH, which provides a spacer between the biotin group and the peptide sequence, ensuring good enough exposure of the peptide to be used as an antigen for the detection of antibodies. Biotinylated-CFFCP1 was then bound to plates previously treated with Neutravidin that guarantee a higher binding efficiency, minimizing non-specific interactions. In this last methodology, significantly lower ratios of antigen peptides, serum samples and secondary antibodies were needed to perform the ELISA assay with low background and high signal-to-noise ratios.

Home-designed ELISA assays were carried out and results were used to determine the best coating strategy based on their reproducibility. In order to determine this parameter, the coefficient of variation (CV%) was calculated for both conditions (biotinylated vs. non-biotinylated CFFCP1) [23]. To do that, 40 serum samples were tested in duplicate in the same plate and the obtained results were used to determine intra-assay variability. Analysis of the same group of samples in the same conditions on an independent day was used to establish inter-assay variability.

The overall mean \pm SEM of the intra-assay CV for the biotinylated CFFCP1 was 3.7 ± 0.4 and 12.7 ± 2.1 for the inter-assay variability. Results with the non-biotinylated CFFCP1 presented higher intra-assay CV (9.9 ± 1.0) and inter-assay variability (32.5 ± 3.8). A comparison of CVs in both groups showed statistically significant differences ($p < 0.0001$) for both intra-assay and inter-assay variability. Previously described criteria stated that the maximum acceptable CV for intra-assay variability and inter-assay variability is 15% to 20% [24,25]. The biotinylated CFFCP1 rendered more reproducible outcomes, with all individual CVs under the criterion of 15%, both for intra-assay and inter-assay variability, while this was not the case for the non-biotinylated peptide (Figure S1, Supplementary Material). Consequently, in this work, all further analyses were performed using the biotinylated form of the peptide antigens.

2.2. Citrullinated/Homocitrullinated Chimeric Peptides

Based on the primary structure of the CFFCP1, new peptide antigens were synthesized by SPPS. Three citrullinated/homocitrullinated chimeric peptides (CFFCHP1, CFFCHP2 and CFFCHP3) were synthesized incorporating homocitrulline at positions 620 and/or 625 of CFFCP1. These CFFCHPs were also labeled in solid phase at the N-terminal position with N-Biotinyl-NH-(PEG)₂-COOH. Cyclization was performed in solution by the formation of an intramolecular disulfide bond upon oxidation of cysteinyl residues. Peptides were purified by reverse-phase, high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), achieving a purity $\geq 95\%$. Peptide primary sequences showing the specific PTMs incorporated as well as their characterization by HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) are illustrated in Figure 2.

Biotinyl-PEG ₂ -HSTKRGHAhCitSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRRCGRSGS				
Peptide ID	MW	HPLC (t _R)	LRMS calcd.	LRMS found.
Composition	(g/mol)	(min)		
CFFCHP1	4582.12	13.79	4583.1	4583.3
C ₁₈₂ H ₃₀₇ N ₇₇ O ₅₇ S ₃				
Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitRGHAKSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRRCGRSGS				
Peptide ID	MW	HPLC (t _R)	LRMS calcd.	LRMS found.
Composition	(g/mol)	(min)		
CFFCHP2	4582.12	12.62	4583.1	4581.0
C ₁₈₂ H ₃₀₇ N ₇₇ O ₅₇ S ₃				
Biotinyl-PEG ₂ -HSThCitRGHAhCitSRPVCitG-HQCHQESTCitGRSRGRRCGRSGS				
Peptide ID	MW	HPLC (t _R)	LRMS calcd.	LRMS found.
Composition	(g/mol)	(min)		
CFFCHP3	4625.15	14.67	4626.1	4626.2
C ₁₈₃ H ₃₀₈ N ₇₈ O ₅₈ S ₃				

Figure 2. Primary sequences of citrullinated/homocitrullinated chimeric peptides. Peptide identification (ID), elemental composition, molecular weight (MW), chromatographic retention time (t_R) by HPLC and mass calculated and found by low-resolution mass spectrometry (LRMS) were obtained by ESI-MS.

Citrullinated as well as citrullinated/homocitrullinated cyclic chimeric peptides were comparatively tested using a panel of 178 RA serum samples and a control panel of

120 blood donor sera. The distribution of fine specificities and isotypes was also studied (Table 1).

Table 1. Anti-ACPA and anti-AMPA fine specificities in RA patients.

RA Population (<i>n</i> = 178)	α -IgG	α -IgA	α -IgM
anti-CFFCP1-positive (%)	101 (56.7)	60 (33.7)	40 (22.5)
median titer anti-CFFCP1 AU/mL (IQR)	45 (456)	0 (55)	0 (48)
anti-CFFCHP1-positive (%)	104 (58.4)	64 (36.0)	37 (21.3)
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	55 (469)	6 (52)	0 (40)
anti-CFFCHP2-positive (%)	103 (57.8)	70 (39.3)	41 (23.0)
median titer anti-CFFCHP2AU/mL (IQR)	52 (590)	12 (66)	0 (52)
anti-CFFCHP3-positive (%)	102 (57.3)	64 (36.0)	41 (23.0)
median titer anti-CFFCHP3AU/mL (IQR)	69 (503)	18 (54)	0 (73)

IgG was the predominant isotype in the RA population. The proportion of positive anti-ACPA (anti-CFFCP1) in the main population was 56.7%, while the positivity for anti-CFFCHP1, anti-CFFCHP2 and anti-CFFCHP3 was 58.4%, 57.8% and 57.3%, respectively. Fine specificities for IgG and IgA were more frequent when the antigen was doubly modified (citrullinated and homocitrullinated) compared to anti-ACPA specificities. Likewise, median titers were also higher than those of anti-ACPA. The IgM anti-AMPA isotype was found in 23% for anti-CFFCHP2 and anti-CFFCHP3, whereas this value was slightly reduced for anti-CFFCHP1 (21.3%) and anti-ACPA (22.5%).

2.3. Anti-AMPA and RA-ILD

Based on our previous findings [22] and to gain further insight into the role of the homocitrullination in RA-ILD, we have analyzed the reactivity of the CFFCHPs with two panels of sera (37 sera from RA-ILD patients and 141 sera from RA non-ILD patients), which both constitute the main RA population studied in Section 2.2. As already described for anti-carbamylated protein antibodies, all anti-AMPA fine specificities were more frequent in the RA-ILD group (Table 2). In addition, the median titers were also higher in the RA-ILD group. The differences were statistically significant for anti-AMPA-IgA and IgM isotypes and were particularly highly significant ($p < 0.005$) for anti-CFFCHP1-IgA.

2.4. Citrullinated/Homocitrullinated/Acetylated Chimeric Peptide

Due to the fact that RA-ILD has been associated with different anti-modified protein antibodies based on citrulline [26–28], and more recently, homocitrulline [22] and malondialdehyde–acetaldehyde adducts [29], a novel peptide antigen bearing multiple PTMs was synthesized and tested with RA-ILD and RA-non-ILD sera panels.

Based on the primary structure of the CFFCHP1 peptide, the antigen that detected a significantly higher percentage of RA-ILD for the IgA isotype (anti-CFFCHP1-IgA 59.4% in RA-ILD, Table 2), a novel peptide antigen incorporating acetyl-lysine within the peptide sequence was synthesized. Chimeric fibrin/filaggrin citrullinated/homocitrullinated/acetylated peptide (CFFCHAP) preserves the homocitrulline at 625 and the citrulline at 630 positions of the α -fibrin (617–631) domain of the CFFCHP1 peptide, but incorporates an acetylated lysine at the 620 position. The peptide was synthesized by SPPS, biotinylated at the N-terminus and cyclized as described for the previously described peptides. Additionally, this peptide was purified to a grade $\geq 95\%$. The primary sequence of CFFCHAP as well as its characterization by HPLC and ESI-MS are shown in Figure 3.

Table 2. Autoantibody status in RA patients (ILD vs. non-ILD).

	RA-ILD (n = 37)	RA-non-ILD (n = 141)	p-Value
CFFCHP1			
anti-CFFCHP1-IgG-positive (%)	24 (64.8)	80 (56.7)	NS
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	113 (2525)	49 (292)	NS
anti-CFFCHP1-IgA-positive (%)	22 (59.4)	42 (29.8)	<0.005
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	31 (497)	3 (34)	<0.005
anti-CFFCHP1-IgM-positive (%)	12 (32.4)	25 (17.7)	0.05
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	0 (537)	0 (33)	0.04
CFFCHP2			
anti-CFFCHP2-IgG-positive (%)	25 (67.6)	78 (55.3)	NS
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	134 (2126)	43 (377)	NS
anti-CFFCHP2-IgA-positive (%)	21 (56.7)	49 (34.8)	0.02
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	24 (374)	5 (51)	<0.005
anti-CFFCHP2-IgM-positive (%)	13 (35.1)	28 (19.8)	0.05
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	10 (359)	0 (39)	0.01
CFFCHP3			
anti-CFFCHP3-IgG-positive (%)	25 (67.6)	77 (54.6)	NS
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	135 (2826)	54 (351)	NS
anti-CFFCHP3-IgA-positive (%)	19 (51.3)	45 (31.9)	0.03
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	27 (308)	16 (31)	0.009
anti-CFFCHP3-IgM-positive (%)	13 (35.1)	28 (19.8)	0.05
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	22 (440)	0 (46)	0.007

Peptide ID	MW	HPLC t_R	LRMS calcd.	LRMS found.
Composition	(g/mol)	(min)	m/z	m/z
CFFCHAP	4625.15	11.13	4626.1	4624.8
$C_{157}H_{263}N_{71}O_{52}S_2$				

Figure 3. Primary sequence of chimeric fibrin/filaggrin citrullinated/homocitrullinated/acetylated peptide (CFFCHAP). Peptide identification (ID), elemental composition, molecular weight (MW), chromatographic retention time (t_R) by HPLC and mass calculated and found by low-resolution mass spectrometry (LRMS) were obtained by ESI-MS.

As shown in Table 3, anti-CFFCHAP fine specificities were more frequent in the RA-ILD group (anti-CFFCHAP-IgG 64.9% vs. 50.4%; anti-CFFCHAP-IgA 48.6% vs. 28.4%; anti-CFFCHAP-IgM 35.1% vs. 19.8%). Of note, this difference was statistically significant for the IgA isotype ($p = 0.02$). The median titers were also higher in the RA-ILD group and the differences were statistically significant for IgA and IgM isotypes, but also for IgG ($p < 0.05$), a finding not observed with the double-PTM-modified autoantibodies.

Table 3. Autoantibody status in RA patients (ILD vs. non-ILD).

	RA-ILD (n = 37)	RA-Non-ILD (n = 141)	p-Value
CFFCHAP			
anti-CFFCHAP-IgG-positive (%)	24 (64.9)	71 (50.4)	NS
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	67 (3123)	23 (211)	0.008
anti-CFFCHAP-IgA-positive (%)	18 (48.6)	40 (28.4)	0.02
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	18 (319)	0 (33)	0.01
anti-CFFCHAP-IgM-positive (%)	13 (35.1)	28 (19.8)	0.05
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	17 (267)	0 (24)	0.02

Figure 4 shows the overlap between antibodies against peptides containing one, two or three PTMs in their primary sequence as a function of the isotype studied in RA-ILD patients. For the IgG isotype, the peptide bearing three PTMs was able to detect 5.4% of the anti-peptide antibodies that were negative for the peptides with one and two PTMs. For the IgM isotype, this percentage was 2.7%, and the same was obtained for the peptide with one PTM. However, for the IgA isotype, the highest percentage was obtained for the double-modified peptide (8.1%). In general terms, for IgG and IgM isotypes, it should be noted that the presence of two or three PTMs within peptide antigen allows the detection of 5.4% of RA-ILD-negative sera. It is noteworthy that for the IgA isotype, the presence of two or three PTMs was able to detect a percentage close to 20% of RA-ILD sera that were negative when analyzed with the peptide bearing a single PTM.

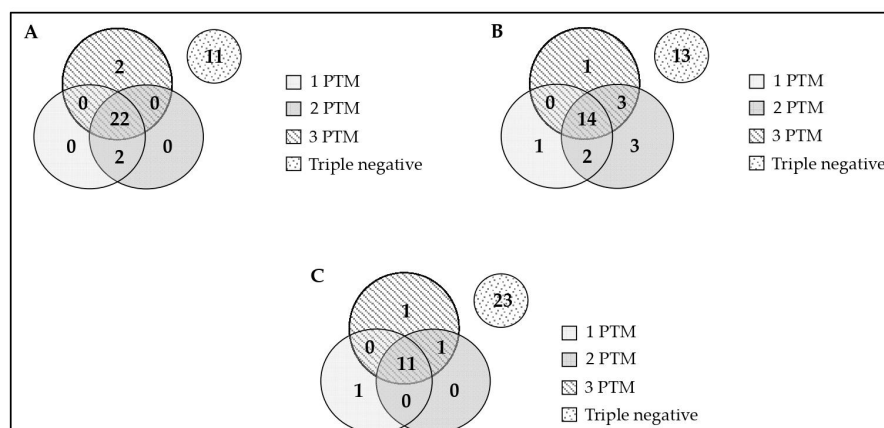


Figure 4. Isotype antibodies overlap in ILD patients (A) IgG, (B) IgA and (C) IgM. Overlap between anti-CFFCP1 (chimeric cyclic peptide bearing one PTM: citrulline), anti-CFFCHP1 (chimeric cyclic peptide bearing two PTMs: citrulline and homocitrulline) and anti-CFFCHAP (chimeric cyclic peptide bearing three PTMs: citrulline, homocitrulline and acetyl-lysine) antibodies.

2.5. Association of Anti-Chimeric Peptide Autoantibodies with the Severity of Articular Disease (Joint Destruction)

We further analyzed whether the presence or titers of the different autoantibodies are associated with the severity (joint destruction) in RA patients. We have classified the patients according to the presence of erosive disease assessed by radiographs of hands or feet. Articular damage was scored according to the modified Larsen method (score ranged from 0 to 200) [30]. We classified the severity of joint damage as severe or mild according to the results (cut-off) of the median Larsen score (>18 and <18, respectively).

Although a trend to associate the presence or titers of the anti-modified peptide autoantibodies with the presence of erosive disease was observed, the differences were not statistically significant. Erosive disease was especially more frequently found in patients

with positive autoantibodies against CFFCHP1, with all the isotype proportions being higher for patients with erosive disease than for those with non-erosive disease. In addition, interquartile ranges (IQR) were also higher in erosive disease for the double- and triple-modified peptides and all the isotypes tested (Table S1 of Supplementary Material).

In addition, when accounting for the degree of joint destruction according to the modified Larsen score, a clear association with the different autoantibodies was observed with a higher prevalence of autoantibodies in patients with more severe joint damage in comparison to those with mild joint destruction. The differences were statistically significant in almost all specificities, and especially for IgA and IgM isotypes. Interestingly, only the frequency of antibodies of the IgG isotype against the triple PTM peptide (anti-CFFCHAP-IgG-positive) was higher in patients with severe joint damage, with statistical significance (Table 4).

Table 4. Comparison of the presence of autoantibodies with the degree of joint destruction according to the modified Larsen score.

Median Larsen Score 18	Larsen < 18 (n = 88)	Larsen ≥ 18 (n = 90)	p-Value
CFFCHP1			
anti-CFFCHP1-IgG-positive (%)	46 (52.3)	58 (64.4)	NS
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	34 (181)	101 (764)	0.02
anti-CFFCHP1-IgA-positive (%)	24 (27.3)	40 (44.4)	0.02
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	0 (26)	11 (127)	0.008
anti-CFFCHP1-IgM-positive (%)	13 (14.8%)	24 (26.7)	0.05
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	0 (17)	0 (109)	0.04
CFFCHP2			
anti-CFFCHP2-IgG-positive (%)	46 (52.3)	57 (63.3)	NS
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	28 (166)	86 (1164)	0.03
anti-CFFCHP2-IgA-positive (%)	28 (30.7)	42 (46.7)	0.04
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	4 (33)	18 (143)	0.008
anti-CFFCHP2-IgM-positive (%)	14 (15.9)	27 (30.0)	0.03
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	0 (25)	0 (94)	0.02
CFFCHP3			
anti-CFFCHP3-IgG-positive (%)	45 (51.1)	57 (63.3)	NS
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	24 (233)	107 (807)	0.02
anti-CFFCHP3-IgA-positive (%)	28 (30.7)	36 (40.0)	NS
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	16 (29)	20 (134)	0.05
anti-CFFCHP3-IgM-positive (%)	14 (15.9)	27 (30.0)	0.03
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	0 (34)	0 (111)	0.01
CFFCHAP			
anti-CFFCHAP-IgG-positive (%)	40 (45.4)	55 (61.1)	0.036
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	18 (109)	55 (891)	0.01
anti-CFFCHAP-IgA-positive (%)	21 (23.9)	37 (41.1)	0.01
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	0 (23)	18 (133)	<0.005
anti-CFFCHAP-IgM-positive (%)	16 (18.2)	25 (27.8)	NS
median titer anti-CFFCHAP AU/mL (IQR)	0 (20)	0 (45)	0.03

3. Discussion

Previously published results in our group demonstrated that Cit⁶³⁰-bearing peptides from α -fibrin protein, covalently coupled to the cyclic filaggrin peptide, which constitutes the CCP1 test, were the most reactive ACPA epitopes, demonstrating a comparable sensitivity and specificity for RA to the gold standard commercial CCP2 test [19]. Based on the primary structure of this peptide (CFFCP1), several peptide antigens that resulted from the substitution of lysine for homocitrulline were designed and synthesized. Three citrulli-

nated/homocitrullinated chimeric peptides (CFFCHP1, CFFCHP2 and CFFCHP3) were obtained with homocitrulline at positions 620 and/or 625 of the [Cit⁶³⁰] α -fibrin (617–631) domain. Regarding the higher sensitivity observed for CFFCHP1 in RA-ILD patients, a novel peptide antigen bearing three PTMs, citrullinated/homocitrullinated/acetylated chimeric peptide (CFFCHAP), with acetylated lysine at 620, homocitrulline at 625 and citrulline at 630 respective positions of α -fibrin (617–631), was also obtained by SPPS.

As previously described, citrullination, homocitrullination and acetylation are the most important and known post-translational modifications of proteins found in RA, although the exact role of these PTMs in RA pathogenesis is poorly understood. Besides, other protein modifications such as aberrant glycosylation may also participate in the activation of the immuno-response in RA. Genetics, including epigenetics and environmental factors such as smoking or infections (periodontitis), seem to have relevant implications in protein modifications and, consequently, in the initiation of the altered immuno-response in RA [2,3,31].

In this study, we compared the reactivity of these three different PTMs (anti-citrulline, anti-homocitrulline and anti-acetyl-lysine reactivities) in RA patients using the same peptide antigen, to be able to directly perform this comparison by using the appropriate peptide controls. To our knowledge, for the first time, the three more relevant PTMs in RA have been sequentially introduced into a single peptide in specific positions of a well-known peptide-based autoantibody trigger that derives of fibrin and filaggrin proteins [16,19]. This is of paramount importance to ensure that the reactivity against a chemically well-defined antigen is consistently tested and constitutes the main strength of this study. Contrarily, when working with antigens that contain multiple proteins (fetal calf serum, FCS) or even with single proteins (bovine serum albumin, BSA), the processes of PTM introduction (citrullination, carbamylation, acetylation reactions) lead to heterogeneous antigen epitopes between batches, and consequently, the reproducibility of results may result as compromised.

The association of the different AMPAs with the clinical phenotype of RA, focused on significant disease outcomes (presence of severe joint damage and interstitial lung disease), was studied. In general, the association was confirmed with the different autoantibodies, and especially for the IgA and IgM isotypes. Our findings are in accordance with previous reports confirming the association of ACPAs with joint damage [32] and ILD [33]. Furthermore, anti-CarP has also been associated with more severe joint damage in patients with RA [34], and recently we confirmed the association of these autoantibodies with ILD in RA, with the highest odds ratio for the IgA isotype [22]. The performance of the triple-PTM-modified peptide (CFFCHAP) was similar to that observed with the double-PTM-modified peptides (CFFCHP1, CFFCHP2 or CFFCHP3), although the prevalence of severe joint damage as described above was only statistically significant for the IgG isotype when working with the peptide bearing the three PTMs. Furthermore, the median titers of IgG anti-CFFCHAP were significantly higher in patients with RA-ILD, a finding not observed for the IgG isotype when working with the modified peptides not bearing acetyl-lysine. Whether this finding may be explained by a significant role of anti-acetylated peptide antibodies in the pathogenesis of RA-ILD is not known. Therefore, the accuracy of triple PTMs in predicting more severe joint damage in RA deserves further investigation. Of note, in a recent report, the coexistence of the three types of autoantibodies against three versions (citrullinated, homocitrullinated and acetylated) of a vimentin peptide has also been associated with the higher rates of radiographic joint progression in patients with early RA [35].

A limitation of the present work is that the antigen peptide bearing the three PTMs does not consider other proteins that are also present at the rheumatoid synovial, such as alpha-enolase or vimentin. Future peptides containing these three PTMs will be designed to address the still unmet need of identifying those RA patients that will develop ILD. The development of novel biomarkers associated with severe diseases such as ILD would allow an improvement in the diagnosis and treatment of this complication in RA patients.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Solid-phase reactions were performed using a 20 mL syringe that contains a polyethylene filter (Bond Elut, Agilent, CA, USA). NovaSyn TGR resin and 9-fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids were purchased from Novabiochem (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Peptide-synthesis-grade dimethylformamide (DMF) and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC-grade acetonitrile (CH₃CN) was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Acetic and hydrochloric acids were from Panreac (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). Diethyl ether, Na₂CO₃ anhydro, NaHCO₃, NaCl, Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS), KH₂PO₄, Na₂HPO₄ and KCl were obtained from Merck (KGaA, Darmstadt, Germany). The coupling reagent, 2-(1H-7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate methanaminium (HATU), was from Genscript (Piscataway, USA). Diisopropylethylamine (DIPEA), triethylamine (Et₃N), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), piperidine, triisopropylsilane (TIS), 2-mercaptoethanol, bovine serum albumin (BSA), SigmaFast OPD, Tween 20, Triton X-100, fetal bovine serum (FBS), sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate (SDS) and H₂SO₄ were purchased from Fluka-Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

96-well microtiter plates, Nunc MaxiSorp™ flat-bottom and Neutravidin Protein were from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA).

Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Human IgG Specific for Gamma-Chains was purchased from DAKO (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human IgM, Fc5μ Fragment Specific and Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human serum IgA were from Jackson ImmunoResearch (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK).

Cyclic peptides were purified by HPLC on a semi-preparative scale on an Agilent Technologies 1260 Infinity chromatograph using an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (semi-preparative RP, 9.4 × 250 mm, particle size 5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pure peptides were characterized by UPLC-MS on a Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Mildford, MA, USA) using the column ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (RP, 2.1 × 100 μm, particle size 1.7 μm) with both detector UV-Vis and an electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) Waters LCT Premier XE (Micromass Waters, Milford, MA, USA). Plates were incubated on a Memmert IN30 (Schwabach, Germany) incubator, and a LT3500 (Labtech, Ringmer, East Sussex, UK) microplate washer was used for the washing cycles during the immunoassay, and finally, read in a LT4500 microplate reader (Labtech, Ringmer, East Sussex, UK). Lyophilization was performed on a Christal Alpha 2–4 LD Plus freeze-dryer (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). Evaporation in vacuo was performed on a Heidolph Laborota 4001 efficient (Heidolph Instruments GmbH & CO, Schwabach, Germany). Purified products were weighted on an analytical microbalance Mettler Toledo XPR2 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland).

4.2. Synthesis of Cyclic Chimeric Peptides

Peptides were manually synthesized on a NovaSyn® TGR resin as C-terminal carboxamides. Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS) was carried out following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl/t-butyl orthogonal protection strategy. Amino acid side-chain protection was effected by the following: triphenylmethyl (Trt) for glutamine, asparagine and histidine; tert-butyl (tBu) for aspartic acid, glutamic acid, serine, threonine and tyrosine; 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl (Pmc) for arginine and tert-butoxycarbonyl (Boc) for lysine and tryptophan. Two residues of Fmoc-S-acetamidomethyl-L-cysteine (Fmoc-Cys(Acm)-OH) were introduced in the peptide sequences for their subsequent oxidation and formation of disulfide bonds. Fmoc-citrulline, Fmoc-homocitrulline and the acetylated lysine, Fmoc-Lys(Ac)-OH, were introduced as post-translational modifications at specific positions of the peptide sequences.

The coupling reactions were performed using three-fold molar excesses of Fmoc-L-amino acids activated by treatment with HATU and DIPEA throughout the synthesis. The Fmoc deprotection was accomplished twice with 20% (*v/v*) piperidine in DMF for 10 min. All coupling and deprotection steps were checked by the Kaiser test, based on the reaction of ninhydrin with primary amines, or the chloranil test, that allows reliable detection of secondary amino groups.

Once the elongation of the peptide sequences was completed, a fraction of each peptidyl-resin was biotinylated at the N-terminus. The biotinylation step was completed by means of the addition of N-biotinyl-NH-(PEG)₂-COOH (4 equivalents) dissolved in a minimal volume of DMF and in the presence of a phosphonium salt (benzotriazole-1-ylxytris(pirrolidino) phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP, 4 equivalents), as well as 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 4 equivalents) and a base such as diisopropylethylamine (DIPEA, 8 equivalents). The reaction was left overnight and was checked by the Ninhydrin colorimetric reaction.

Finally, peptides with and without biotin were cleaved from the resin by means of treatment with 94% TFA in the presence of scavengers (2.5% *v/v* H₂O, 2.5% *v/v* TIS, 1% *v/v* 2-mercaptoethanol) for 5 h. The TFA was evaporated under N₂ flow. Diethyl ether was added to precipitate the crude peptides, which were isolated by centrifugation (4000 rpm, 5 °C, 10 min). The precipitates were dissolved in acetic acid 10%, frozen in a dry ice/acetone bath (−78 °C) and lyophilized.

Cyclization of peptides by forming a disulfide bridge was performed in solution. Peptides were dissolved in AcOH/H₂O (1:1, 1 mg/mL) under N₂, then HCl (1 M, 0.1 mL/mg) followed by I₂ (20 equiv/Acm) were added. After 4 h, I₂ was quenched by the addition of 1 M of ascorbic acid dropwise until the mixture became colorless. The mixture was then concentrated and evaporated under reduced pressure to approximately one third of the original volume.

Cyclic peptides without biotin were purified by semi-preparative RP-HPLC in a Zorbax C₁₈ Column (Agilent, 5 μm, 9.4 × 250 mm) at a flow rate of 2.5 mL/min and a detection wavelength of 220 nm. The solvents were prepared as CH₃CN (0.05% TFA) and H₂O (0.05% TFA) and a linear gradient of 0–25% CH₃CN in H₂O over 20 min was performed. The purified chimeric peptides (with a purity higher than 95%) were characterized by HPLC and ESI-MS.

Cyclic biotinyl-peptides were purified using the same equipment and conditions but with a linear gradient of 5–95% CH₃CN in H₂O over 20 min. The purified chimeric biotinyl-peptides (with a purity higher than 95%) were characterized by HPLC and ESI-MS.

4.3. Study Design

A cross-sectional study including a panel of 178 RA patients diagnosed according to the 2010 ACR/EULAR criteria assessed in a rheumatology department outpatient clinic of a tertiary university hospital was performed. Individuals fulfilling other inflammatory arthritis or connective tissue disease diagnostic criteria were excluded. A panel of 120 blood donors was also tested as controls.

4.4. ELISA Assays

4.4.1. Home-Designed ELISA Assay with Peptides Covalently Bound to Microtiter Plates

Peptide sequences were covalently coupled to 96-well microtiter plates (Nunc Immobilizer Amino F96-Clear, ThermoFisher, Roskilde, Denmark). Briefly, peptides were diluted to 10 μg/mL in 0.05 M of carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer, and 100 μL of peptide solutions were added to each well. Plates were incubated overnight at 4 °C. After overnight incubation, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M of carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer for 1 h at room temperature.

Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA wt/v, 350 mM NaCl, 10 mM TRIS, 1% *v/v* Triton X-100, 0.5% wt/v Na-deoxycholate, 0.1% wt/v SDS) supplemented with 10%

fetal bovine serum. A volume of 100 μ L of the sera dilution was added to each well and incubated for 1.5 h at room temperature.

Afterwards, each plate was washed 6 times with PBS/0.05% Tween-20 and anti-human secondary IgG antibody conjugated to peroxidase diluted 1:1000 in RIA buffer was added to each well and incubated for 1 h. Plates were washed 6 times with PBS/0.05% Tween-20 and detection of bound antibodies was carried out using SigmaFast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), with o-phenylenediamine dihydrochloride as a substrate. Reaction was stopped with 50 μ L of 2N H₂SO₄ and plates were read at 492 nm.

Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample to estimate the background reading. All sera were tested in duplicate. Each plate contained a series of successive dilutions of a pool of sera from four positive patients in order to generate a reference standard used to convert optical density (OD) values to arbitrary units (AU).

Reactivity to the non-citrullinated and non-homocitrullinated chimeric peptides (unmodified basal structure) was subtracted from the reactivity to the citrullinated and homocitrullinated peptides to ensure the reactivity shown was specific to the post-translational modifications.

Non-linear regression analysis to convert OD to AU was conducted and ROC curve analysis was performed using GraphPad Prism 7. Cut-off values were determined with a specificity of 95% in comparison with a healthy population of blood donors. A positive cut-off value was defined for each antigen: ≥ 14 for CFFCP-1, ≥ 27.5 for CFFCHP-1, ≥ 10.5 for CFFCHP-2 and ≥ 11 for CFFCHP-3.

To consider a serum positive and specific for the post-translational modification (citrullination/homocitrullination), the UA/mL had to be higher than the established cut-off and the OD resulting from the difference between the citrullinated/homocitrullinated antigen and the unmodified antigen had to be >0.1 , as stated in the previously described methodology [20].

4.4.2. Home-Designed ELISA Assay with Biotinyl-Peptides Bound to Neutravidin Derivatized Microtiter Plates

MaxiSorp microtiter plates were incubated with Neutravidin protein diluted in PBS (0.5 μ g/well) overnight at 4 °C and thereafter, 1 h at 37 °C. After washing the plates, the biotinyl-peptides were diluted at 1 μ g/mL in PBS and 100 μ L of the peptide solution was added to each well. The plates were incubated for 1 h at 37 °C. Subsequently, the plates were blocked with 2% BSA in PBS with 0.05% Tween-20 for 30 min at 37 °C. Then, the plates were washed 3 times.

Sera were diluted 250-fold in RIA buffer supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 μ L of the dilution was added to each well. The plates were incubated for 1 h at 37 °C and then overnight at 4 °C.

Afterwards, each plate was washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20 and 100 μ L of anti-human secondary antibody conjugated to peroxidase was added to each well and incubated for 1 h at 37 °C. Three different isotypes were tested. Anti-human IgG, anti-human IgM and anti-human serum IgA secondary antibodies were diluted in RIA buffer at 1:4000; 1:2000 and 1:10,000, respectively.

After washing the plates, detection of bound antibodies was carried out using SigmaFast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), with o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) as a substrate. Reaction was stopped with 50 μ L of 2N H₂SO₄ and plates were read at 492 nm.

All sera were tested in duplicate. Each plate contained a series of successive dilutions of a pool of sera from four positive patients in order to generate a reference standard used to convert optical density (OD) values to arbitrary units (AU).

Reactivity to the non-citrullinated, non-homocitrullinated and non-acetylated chimeric peptides (unmodified basal structure) was subtracted from the reactivity to the citrullinated, homocitrullinated and acetylated peptides to ensure the reactivity shown was specific to the post-translational modifications.

Non-linear regression analysis in order to convert OD to AU was conducted and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed using GraphPad Prism 7. Cut-off values were determined with a specificity of 95% in comparison with a healthy population of blood donors. A positive cut-off value was defined for each antigen, as shown in Table 5.

Table 5. Cut-off values determined for each antigen with a specificity of 95%.

	IgG	IgA	IgM
Anti-CFFCP1	≥11.5	≥8.5	≥55.0
Anti-CFFCHP1	≥18.0	≥20.5	≥52.5
Anti-CFFCHP2	≥15.0	≥21.5	≥60.0
Anti-CFFCHP3	≥17.5	≥26.5	≥84.5
Anti-CFFCHAP	≥19.5	≥25.5	≥42.5

To consider a serum positive and specific for the post-translational modification (citrullination/homocitrullination/acetylation), the UA/mL had to be higher than the established cut-off and the OD resulting from the difference between the citrullinated/homocitrullinated/acetylated antigen and the unmodified antigen had to be >0.

4.5. Statistical Analysis

Proportion differences were compared using the χ^2 or Fisher's exact test. Continuous variables were analyzed using the Mann–Whitney U test and presented as median and interquartile range. Statistical significance was established as two-tailed *p*-values < 0.05 in all analyses, which were found using GraphPad Prism 7. Missing data were handled with listwise deletion.

4.6. Ethics

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

5. Conclusions

For the first time, we described a novel peptide-based antigen bearing citrulline, homocitrulline and acetyl-lysine within its sequence (CFFCHAP), that associates with the clinical phenotype of rheumatoid arthritis.

The prevalence of joint destruction as well as the interstitial lung disease extra-articular involvement was statistically significant for patients having anti-CFFCHAP antibodies, specifically the IgA isotype.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222413290/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, I.H. and R.S.; methodology, C.G.-M. and M.J.G.; software, C.G.-M.; validation, I.H., M.J.G. and R.S.; formal analysis, C.G.-M. and R.C.-M.; investigation, I.H. and R.S.; resources, R.C.-M. and M.J.G.; data curation, C.G.-M.; writing—original draft preparation, I.H. and M.J.G.; writing—review and editing, I.H. and R.S.; visualization, C.G.-M. and R.C.-M.; supervision, I.H., M.J.G. and R.S.; project administration, I.H. and M.J.G.; funding acquisition, I.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, and the European Regional Development Fund (Grant No. RTI2018-094120-B-I00).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Hospital Clinic of Barcelona (approval number 2017/0679).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Materials. The data presented of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

Acm	acetamidomethyl
ACPAs	anti-citrullinated protein/peptide antibodies
AMPAs	anti-modified protein/peptide antibodies
anti-APA	antibodies against acetylated proteins
anti-CarP	antibodies against homocitrullinated (carbamylated) peptides/proteins
AU	arbitrary units
Boc	tert-butoxycarbonyl
BSA	bovine serum albumin
CFFCP	chimeric fibrin-filaggrin citrullinated peptide
CFFCHP	chimeric fibrin-filaggrin citrullinated/homocitrullinated peptide
CFFCHAP	chimeric fibrin/filaggrin citrullinated/homocitrullinated/acetylated peptide
CV	coefficient of variation
DIPCDI	N,N'-diisopropylcarbodiimide
DIPEA	diisopropylethylamine
DMF	dimethylformamide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
Fmoc	9-fluorenyl-methoxycarbonyl
HATU	2-(1H-7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate methanaminium
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
ILD	interstitial lung disease
IQR	interquartile range
LRMS	low-resolution mass spectrometry
MW	molecular weight
OD	optical density
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
PAD	peptidylarginine deiminase
PBS	phosphate-buffered saline
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl
PTMs	post-translational modifications
PyBOP	benzotriazole-1-yloxytris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate
RA	rheumatoid arthritis
ROC	receiver operating characteristic
RP-HPLC	reverse-phase high-performance liquid chromatography
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
SPPS	solid-phase peptide synthesis
tBu	tert-butyl
TFA	trifluoroacetic acid
TIS	triisopropylsilane
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethane
Trt	triphenylmethyl

References

1. Haro, I.; Sanmarti, R. Rheumatoid arthritis: Current advances in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 697. [[CrossRef](#)]
2. Mueller, A.L.; Payandeh, Z.; Mohammadkhani, N.; Mubarak, S.M.H.; Zakeri, A.; Bahrami, A.A.; Brockmueller, A.; Shakibaei, M. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells* **2021**, *10*, 3017. [[CrossRef](#)]
3. Kwon, E.J.; Ju, J.H. Impact of Posttranslational modification in pathogenesis of rheumatoid arthritis: Focusing on citrullination, carbamylation, and acetylation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10576. [[CrossRef](#)]
4. Scherer, H.U.; Haupl, T.; Burmester, G.R. The etiology of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **2020**, *110*, 102400. [[CrossRef](#)]
5. Darrach, E.; Andrade, F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, *30*, 72–78. [[CrossRef](#)]
6. Sebbag, M.; Moinard, N.; Auger, I.; Clavel, C.; Arnaud, J.; Nogueira, L.; Roudier, J.; Serre, G. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 2250–2263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. van Delft, M.A.M.; Huizinga, T.W.J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **2020**, *110*, 102392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wang, Z.; Nicholls, S.J.; Rodriguez, E.R.; Kumm, O.; Hörkö, S.; Barnard, J.; Reynolds, W.F.; Topol, E.J.; DiDonato, J.A.; Hazen, S.L. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1176–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Shi, J.; Knevel, R.; Suwannalai, P.; van der Linden, M.P.; Janssen, G.M.C.; van Veelen, P.A.; Levarht, N.E.W.; van der Helm-van Mil, A.H.M.; Cerami, A.; Huizinga, T.W.J.; et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17372–17377. [[CrossRef](#)]
10. Ajeganova, S.; van Steenberg, H.W.; Verheul, M.K.; Forslind, K.; Hafström, I.; Toes, R.E.M.; Huizinga, T.W.J.; Svensson, B.; Trouw, L.A.; van der Helm-van Mil, A.H.M. 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*, 112–118. [[CrossRef](#)]
11. Thiele, G.M.; Duryee, M.J.; Anderson, D.R.; Klassen, L.W.; Mohring, S.M.; Young, K.A.; Benissan-Messan, D.; Sayles, H.; Dusad, A.; Hunter, C.D.; et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adducts and anti-malondialdehyde-acetaldehyde antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **2015**, *67*, 645–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Juarez, M.; Bang, H.; Hammar, F.; Reimer, U.; Dyke, B.; Sahbudin, I.; Buckley, C.D.; Fisher, B.; Filer, A.; Raza, K. Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 1099–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Muller, S. Synthetic peptides as tools for diagnosis and therapeutic strategies to treat systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* **2012**, *11*, 799–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nuti, F.; Peroni, E.; Real-Fernández, F.; Bonache, M.A.; Le Chevalier-Isaad, A.; Chelli, M.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Rovero, P.; Lolli, F.; et al. Posttranslationally modified peptides efficiently mimicking neoantigens: A challenge for theragnostics of autoimmune diseases. *Biopolymers* **2010**, *94*, 791–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Papini, A.M. The use of post-translationally modified peptides for detection of biomarkers of immune-mediated diseases. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 621–628. [[CrossRef](#)]
16. Perez, M.L.; Gomara, M.J.; Ercilla, G.; Sanmarti, R.; Haro, I. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3573–3584. [[CrossRef](#)]
17. Malakoutikhah, M.; Gomara, M.J.; Gomez-Puerta, J.A.; Sanmarti, R.; Haro, I. The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7486–7492. [[CrossRef](#)]
18. Garcia-Moreno, C.; Gomara, M.J.; Bleda, M.J.; Sanmarti, R.; Haro, I. Development of a multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides as proof of concept for diagnosis of rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215927. [[CrossRef](#)]
19. Sanmarti, R.; Graell, E.; Perez, M.L.; Ercilla, G.; Vinas, O.; Gomez-Puerta, J.A.; Gratacos, J.; Balsa, A.; Gomara, M.J.; Larrosa, M.; et al. Diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric fibrin/filaggrin citrullinated synthetic peptides in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11*, R135. [[CrossRef](#)]
20. Hyldgaard, C.; Hilberg, O.; Pedersen, A.B.; Ulrichsen, S.P.; Løkke, A.; Bendstrup, E.; Ellingsen, T. A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: Comorbidity and mortality. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1700–1706. [[CrossRef](#)]
21. Kuwana, M.; Gil-Vila, A.; Selva-O'Callaghan, A. Role of autoantibodies in the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in autoimmune rheumatic disorders. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2021**, *13*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Castellanos-Moreira, R.; Rodriguez-Garcia, S.C.; Gomara, M.J.; Ruiz-Esquide, V.; Cuervo, A.; Casafont-Sole, I.; Ramirez, J.; Holgado, S.; Gomez-puerta, J.A.; Cañete, J.D.; 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. [[CrossRef](#)]
23. Bastarache, J.A.; Koyama, T.; Wickersham, N.E.; Mitchell, D.B.; Mernaugh, R.L.; Ware, L.B. Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study. *J. Immunol. Methods* **2011**, *367*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hanneman, S.K.; Cox, C.D.; Green, K.E.; Kang, D.H. Estimating intra- and inter-assay variability in salivary cortisol. *Biol. Res. Nurs.* **2011**, *13*, 243–250. [[CrossRef](#)]

25. European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*; European Medicines Agency: London, UK, 2011. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed on 21 July 2011).
26. Solomon, J.J.; Matson, S.; Kelmenson, L.B.; Chung, J.H.; Hobbs, S.B.; Rosas, I.O.; Dellaripa, P.F.; Doyle, T.J.; Poli, S.; Esposito, A.J.; et al. IgA antibodies directed against citrullinated protein antigens are elevated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **2020**, *157*, 1513–1521. [[CrossRef](#)]
27. Harlow, L.; Rosas, I.O.; Gochuico, B.R.; Mikuls, T.R.; Dellaripa, P.F.; Oddis, C.V.; Ascherman, D.P. Identification of citrullinated Hsp90 isoforms as novel autoantigens in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 869–879. [[CrossRef](#)]
28. Alunno, A.; Bistoni, O.; Pratesi, F.; La Paglia, G.M.C.; Puxeddu, I.; Migliorini, P.; Gerli, R. Anti-citrullinated alpha enolase antibodies, interstitial lung disease and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2018**, *57*, 850–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. England, B.R.; Duryee, M.J.; Roul, P.; Mahajan, T.D.; Singh, N.; Poole, J.A.; Ascherman, D.P.; Caplan, L.; Demoruelle, M.K.; Deane, K.D.; et al. Malondialdehyde–Acetaldehyde adducts and antibody responses in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol.* **2019**, *71*, 1483–1493. [[CrossRef](#)]
30. Kirwan, J.R. Using the Larsen index to assess radiographic progression in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **2000**, *27*, 264–268.
31. Wada, T.T.; Araki, Y.; Sato, K.; Aizaki, Y.; Yokota, K.; Kim, Y.T.; Oda, H.; Kurokawa, R.; Mimura, T. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *444*, 682–686. [[CrossRef](#)]
32. Jilani, A.A.; Mackworth-Young, C.G. The role of citrullinated protein antibodies in predicting erosive disease in rheumatoid arthritis: A systematic literature review and meta-analysis. *Int. J. Rheumatol.* **2015**, *2015*, 728610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Xie, S.; Li, S.; Chen, B.; Zhu, Q.; Xu, L.; Li, F. Serum anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor increase the risk of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: A meta-analysis. *Clin. Rheumatol.* **2021**, *40*, 4533–4543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Truchetet, M.E.; Dublanc, S.; Barnetche, T.; Vittecoq, O.; Mariette, X.; Richez, C.; Blanco, P.; Mahler, M.; Contin-Bordes, C.; Schaefferbeke, 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nijjar, J.S.; Morton, F.R.; Bang, H.; Buckley, C.D.; van der Heijde, D.; Gilmour, A.; Paterson, C.; McInnes, I.B.; Porter, D.; Raza, K.; et al. The impact of autoantibodies against citrullinated, carbamylated and acetylated peptides on radiographic progression in patients with new-onset rheumatoid arthritis: An observational cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2021**, *3*, e284–e293. [[CrossRef](#)]

Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Severe Rheumatoid Arthritis Patients.

Cristina García-Moreno ¹, María J. Gómara ¹, Raúl Castellanos-Moreira ², Raimon Sanmartí ² and Isabel Haro ^{1,*}

¹ Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18-26, Barcelona 08034, Spain.

² Arthritis Unit, Rheumatology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain.

* Correspondence: isabel.haro@iqac.csic.es

Table S1. Comparison of autoantibodies presenting erosive-RA (yes or not)

	erosive (n=89)	non- erosive (n=89)
CFFCHP1		
anti-CFFCHP1-IgG positive (%)	53 (59.6)	51 (57.3)
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	54 (676)	62 (307)
anti-CFFCHP1-IgA positive (%)	33 (37.1)	31 (34.8)
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	8 (91)	4 (41)
anti-CFFCHP1-IgM positive (%)	20 (22.5)	17 (19.1)
median titer anti-CFFCHP1 AU/mL (IQR)	0 (43)	0 (35)
CFFCHP2		
anti-CFFCHP2-IgG positive (%)	52 (58.4)	50 (56.2)
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	42 (769)	74 (403)
anti-CFFCHP2-IgA positive (%)	35 (39.3)	35 (39.3)
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	10 (90)	12 (43)
anti-CFFCHP2-IgM positive (%)	23 (25.8)	18 (20.2)
median titer anti-CFFCHP2 AU/mL (IQR)	0 (79)	0 (39)
CFFCHP3		
anti-CFFCHP3-IgG positive (%)	52 (58.4)	50 (56.2)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	67 (727)	70 (417)
anti-CFFCHP3-IgA positive (%)	30 (33.7)	34 (38.2)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	18 (94)	18 (39)
anti-CFFCHP3-IgM positive (%)	23 (25.8)	18 (20.2)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	0 (86)	0 (54)
CFFCHAP		
anti-CFFCHP3-IgG positive (%)	47 (52.8)	48 (53.9)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	30 (796)	31 (173)
anti-CFFCHP3-IgA positive (%)	31 (34.8)	27 (30.3)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	11 (48)	0 (33)
anti-CFFCHP3-IgM positive (%)	20 (22.5)	21 (23.6)
median titer anti-CFFCHP3 AU/mL (IQR)	0 (37)	0 (26)

The differences were not significant

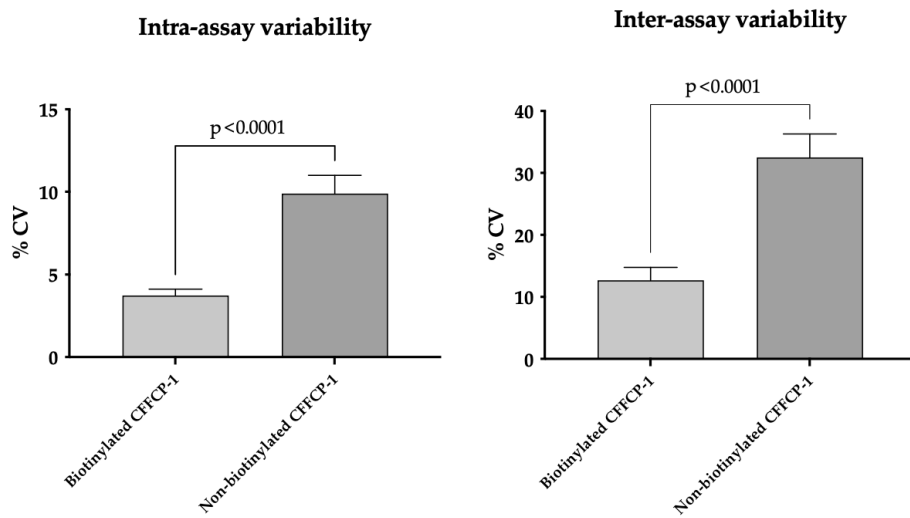


Figure S1. Intra-assay and inter-assay variability for biotinylated and non-biotinylated CFFCP1 peptide.

Article 3

Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Biomarkers towards Personalized Rheumatology

Cristina García-Moreno¹, María J. Gómara¹, Raimon Sanmartí²,
and Isabel Haro¹

¹Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, Barcelona, 08034, Spain;

²Unit of Arthritis, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, 08036, Spain

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune rheumatic disease characterized by the presence of autoantibodies resulting from an immune response triggered by proteins that have undergone post-translational modifications (PTMs) [1]. Citrullination (deimination of arginine), is the best-studied PTM in rheumatology, and for a long time, anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPAs) have been used for RA diagnosis and considered the most relevant serological markers. More recently, other PTMs have been described in the context of RA including homocitrullination (carbamylation) and acetylation, which take place in lysine (Figure 1). Different autoantibodies against these novel modifications (antibodies against modified proteins/peptides, AMPAs) have been linked with interstitial lung disease (ILD), an extra-articular manifestation of RA that entails a high mortality [2,3].

Results and Discussion

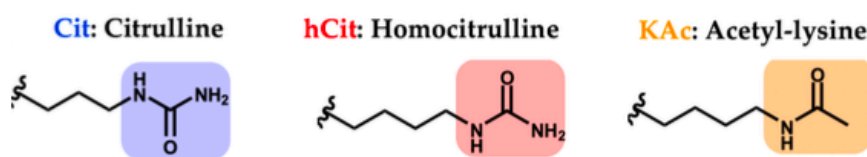


Fig. 1. Chemical structures of relevant PTMs in RA. Citrulline results of the conversion from arginine while homocitrulline and acetyl-lysine come from the conversion of lysine residues.

Previous studies in our group defined a chimeric citrullinated peptide containing α -fibrin and filaggrin domains (CFFCP1, Figure 2) that yielded better results in terms of sensitivity/specificity balance and identified RA patients with poor radiographic outcomes as an antigen compared to the gold standard commercial test [4]. Based on the primary structure of this peptide, a panel of several peptide antigens that resulted from the substitution of lysine for homocitrulline and/or acetyl-lysine were designed (Figure 2), synthesized by solid-phase and tested in a RA population (n=37 RA-ILD vs n=141 RA non-ILD) to study their role as biomarkers linked to the presence of ILD.

The analysis of fine specificities with these novel chimeric peptide antigens demonstrated that IgG was the predominant isotype in the main RA population. IgG and IgA isotypes were more frequent when the antigen was doubly modified (citrullinated/homocitrullinated) compared to anti-ACPA specificities. In addition, all anti-AMPA fine specificities were more frequent in the RA-ILD group. Regarding the IgA isotype, the peptide containing two or three PTMs was able to detect a percentage close to 20% of RA-ILD sera that were negative when analyzed with the peptide bearing a single PTM. Particularly, the mean titers of autoantibodies against the peptide antigen bearing three PTMs, citrullinated/homocitrullinated/acetylated chimeric peptide (CFFCHAP) were statistically significant for IgA and IgM isotypes, but also for IgG ($p < 0.05$) (Figure 3), a finding not observed with the ones against doubly PTM-modified antigens.

Chimeric peptide	α -fibrin(617-631)-S ³⁰⁶ ,S ³¹⁹ cyclo [Cys ³⁰⁶ , ³¹⁹] filaggrin(304-324)
CFFCP1	HSTKRGHAKSRPV Cit G-HQCHQEST Cit GGRSRGRCGRSGS
CFFCHP1	HSTKRGH hCit SRPV Cit G-HQCHQEST Cit GGRSRGRCGRSGS
CFFCHP2	HST hCit RGHAKSRPV Cit G-HQCHQEST Cit GGRSRGRCGRSGS
CFFCHP3	HST hCit RGH hCit SRPV Cit G-HQCHQEST Cit GGRSRGRCGRSGS
CFFCHAP	HST KAc RGH hCit SRPV Cit G-HQCHQEST Cit GGRSRGRCGRSGS

Fig. 2. Primary structure of synthetic cyclic fibrin-filaggrin chimeric peptides bearing citrulline, homocitrulline and acetyl-lysine at specific positions of the α -fibrin (617-631) and cyclic filaggrin (304-324) domains.

When analyzing patients according to the presence of erosive disease assessed by radiographs of hands and feet (Larsen score), a higher prevalence of autoantibodies was found in patients with more severe joint damage (Larsen ≥ 18) in comparison to those with mild joint destruction (Larsen < 18). The differences were statistically significant in almost all specificities, and especially for IgA and IgM isotypes. Interestingly, only the frequency of antibodies of the IgG isotype against the triple PTM peptide (anti-CFFCHAP-IgG-positive) was higher in patients with severe joint damage, with statistical significance.

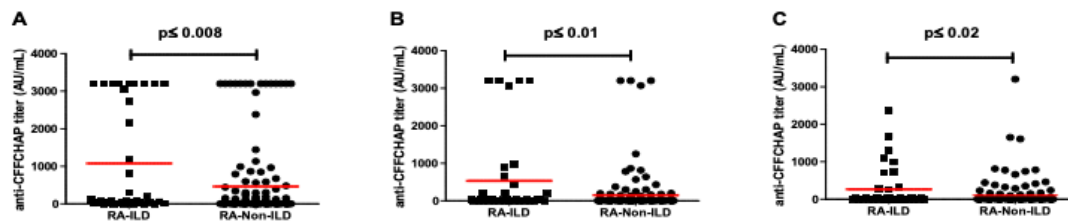


Fig. 3. Comparison of anti-CFFCHAP titers (AU/mL) for RA-ILD vs RA-non-ILD patients. A) IgG; B) IgA and C) IgM isotypes. Horizontal lines depict mean titers. Statistical significances were established as two-tailed p -values < 0.05 after analyzing the continuous variables using the Mann-Whitney U test.

For the first time, we described a novel peptide-based antigen bearing citrulline, homocitrulline and acetyl-lysine into the same peptide sequence to consistently detect severe phenotypes in CFFCHAP positive RA patients. We demonstrated an association between the presence and levels of AMPA titers and severe manifestations of RA such as joint destruction and ILD [5].

Acknowledgments

Financial support from the MINECO and the European Region Development Fund (Grants No. RTI2018-094120-B-I00 and PID2021-122216OB-I00) is gratefully acknowledged.

References

1. Scherer, H.U., et al. *J. Autoimmun.* **110**, 102400 (2020), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
2. Hyldgaard, C., et al. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1700-1706 (2017), <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211138>
3. Castellanos-Moreira, R., et al. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, 587-594 (2020), <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216709>
4. Sanmarti, R., et al. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R135 (2009), <http://dx.doi.org/10.1186/ar2802>
5. García-Moreno, C., et al. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13290 (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms222413290>

Comunicació EULAR 2022

Hospitalar Universitário de São João, Rheumatology Department, Porto, Portugal; ²Faculty of Medicine, University of Porto, Center for Health Technology and Services Research (CINTESIS), Porto, Portugal; ³Faculty of Medicine, University of Porto, Department of Medicine, Porto, Portugal; ⁴Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia / Espinho, Rheumatology Department, Vila Nova de Gaia, Portugal; ⁵Centro Hospitalar Universitário do Algarve, Rheumatology Department, UNIAO FREGUESIAS FARO SE SAO PEDRO, FARO, Portugal; ⁶Centro Hospitalar Tondela-Viseu, Viseu, Rheumatology Department, Viseu, Portugal

Background: Fatigue is one of the major complaints of patients with rheumatoid arthritis (RA). However, the literature relating fatigue to other disease-related parameters has presented discrepant results and longitudinal studies with multivariate analyses are scarce.

Objectives: To explore potential associations between fatigue and demographic variables and other patient-reported outcomes (PROMs) in patients with RA treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) over the time.

Methods: A 24-month (24M) monocentric observational retrospective cohort study was conducted. Patients diagnosed with RA, according to the 2010 American College of Rheumatology (ACR)/ European League Against Rheumatism (EULAR) criteria, and registered on the Rheumatic Diseases Portuguese Register (Reuma.pt) who started their first bDMARD between 2015 and 2021 were included. Age, gender, disease duration, body mass index (BMI) and PROMs were obtained by consulting Reuma.pt. Fatigue was monitored at baseline, 12 and 24M using Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT-F), a 13-item questionnaire with a total score ranging from 0 to 52. A score \leq 39 indicates the presence of clinically significant fatigue. Health Assessment Questionnaire (HAQ), EuroQol-5D (EQ-5D), 36-Item Short Form Survey (SF-36), patient global assessment visual analogue scale (VAS) and pain VAS were assessed at baseline, 12 and 24M. Multivariate linear regression models were conducted with FACIT-F as the dependent variable.

Results: A total of 40 patients (47.4 \pm 11.4 years; 90.2% female) with a BMI of 29.87 \pm 8.54 kg/m² and a mean disease duration of 10.4 \pm 5.6 years were included. A total of 47.5% of patients were treated with an anti-TNF. About 85% of patients had clinically significant fatigue at baseline (FACIT-F 26.9 \pm 11.8). At baseline, patient global assessment VAS (β =-0.4, 95%CI [-0.68; -0.095]) and pain VAS (β =-0.34, 95%CI [-0.6; -0.068]) predicted fatigue. SF-36 predicted fatigue at baseline (β =-0.35, 95%CI [0.14;0.56]), 12M (β =-0.23, 95%CI [0.084;0.37]) and 24M (β =-0.26, 95%CI [0.13;0.39]). HAQ predicted fatigue at baseline (β =-12.2, 95%CI [-19.8; -4.5]) and 24M (β =-11.4, 95%CI [-17.47; -5.38]). EQ-5D (β =-39.5, 95%CI [15.84; 63.22]) predicted fatigue at 24M.

Conclusion: Our results showed that pain levels and patient global assessment of disease activity predicted a higher level of fatigue at baseline. The decrease in physical function and a worse overall health status perceived by patient predicted higher fatigue over the time. Previous research has suggested that disease-related factors, such as inflammation, pain or decreased physical function are associated with greater fatigue in RA (1). These findings encourage the pre-treatment screening of fatigue in patients with RA in order to design individualized non-pharmacological approaches in addition to bDMARDs therapy.

REFERENCES:

[1] Katz P. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(5):25.

Disclosure of Interests: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3060

AB0191 OSTEOPOROSIS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: IMPACT ON BIOLOGIC DRUGS TOLERANCE AND SURVIVAL

S. Boussaid¹, K. Saadaoui¹, M. Hassayoun¹, S. Jemmal¹, S. Rahmouni¹, S. Rekiq¹, H. Sahli¹, M. Elleuch¹. ¹Hospital Rabta, rheumatology, Tunis, Tunisia

Background: Osteoporosis is one of the main comorbidity of RA and leads to an increased risk for fragility fractures, which further impair functional ability, quality of life, and life expectancy. The influence of this condition on the maintenance and survival of biotherapies has rarely been studied.

Objectives: To assess the influence of osteoporosis on efficacy, tolerance, and biologic drugs survival.

Methods: We conducted a cross-sectional and observational study. Files of patients with RA on biologics drugs (archived from the files of patients on the National Health Insurance Fund of Tunisia) were studied. Epidemiological characteristics such as age, sex, and comorbidities, were collected. All patients had a bone mineral density measurement. The patients were divided into two groups (a group with G1 osteoporosis and a group without osteoporosis G2). The therapeutic maintenance rate at 12, 24, 36, and 48 months as well as the biologic survival were analyzed using Kaplan-Meier survival curves and compared using the Log-Rank test.

Results: Three hundred and seventy-four files were selected. The average age of our cohort was 55 \pm 12.54 years [20-90]. A female predominance was noted with a sex ratio M/F=0.147. The average duration of RA was 11.7 \pm 6.76 years

[2-41]. Osteoporosis was observed in 78 patients (20.9%). First biologics prescription was: tocilizumab 6% and rituximab 7%, etanercept 54%, adalimumab 14%, certolizumab pegol 13%, infliximab 6%. The maintenance of the first biologic therapy was 40.53 [35.64-45.43] in G1 and 41.44 [39.01-43.86] in G2. The biologic survival curve study did not find any significant difference between the two groups $p=0.598$.

The presence of osteoporosis would increase the risk of stopping biologic therapy without being a statistically significant factor (HR = 1.109, $p=0.602$)

The therapeutic maintenance of the 1st biologic therapy, in the presence of osteoporosis, was on average 40.53 months [35.64-45.43].

Conclusion: Osteoporosis has not hitherto been retained as a determining factor in therapeutic maintenance (1), as was indeed the case in our study. Nevertheless, screening and early management of osteoporosis are necessary since it alone constitutes a risk factor for mortality.

REFERENCES:

[1] Leon L, Rodríguez-Rodríguez L, Rosales Z, Gomez A, Lamas JR, Pato E, et al. Long-term drug survival of biological agents in patients with rheumatoid arthritis in clinical practice. *Scand J Rheumatol.* 2016;45(6):456-60.

Disclosure of Interests: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3225

AB0192 ANTIBODIES AGAINST MODIFIED PROTEIN/PEPTIDE SPECIFICITIES IN RECENT-ONSET PALINDROMIC RHEUMATISM MAY DETERMINE THE EVOLUTION TO RHEUMATOID ARTHRITIS

C. García-Moreno¹, R. Morla², B. Frade-Sosa², L. Tobaolina¹, M. J. Gomara¹, R. Sanmarti², I. Haro¹ on behalf of PALABA study investigators. ¹Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides., Barcelona, Spain; ²Hospital Clinic de Barcelona, Arthritis Unit. Department of Rheumatology, Barcelona, Spain

Background: Palindromic rheumatism (PR) may evolve to rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients with autoantibodies such as rheumatoid factor (RF) or antibodies against modified proteins (AMPA), anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) or anti-carbamylated antibodies (anti-CarP) (1,2). We hypothesized that the specificities and isotype usage of ACPA and anti-CarP may differ between recent-onset PR and established RA, and this could help ascertain the evolution to RA in PR patients.

Objectives: To determine differences in the recognition of epitopes between patients with recent-onset PR and established RA by analysis of AMPA specificities and isotypes.

Methods: Subanalysis using preliminary data of the PALABA study. Two populations included: patients with recent-onset PR include in the PALABA multicenter randomized clinical trial (abatacept vs hydroxychloroquine) at study entry (NCT03669367) and patients with established RA (ACR/EULAR 2010) as controls previously selected from an observational study(3). Only RF and/or ACPA (CCP2) positive patients were selected. PR patients were DMARD naïve and RA patients receiving rituximab or abatacept were excluded. AMPA specificities and isotypes in sera were determined by in-house ELISA tests using as antigens two carbamylated proteins and a panel of chimeric peptides derived from fibrin and filaggrin proteins bearing one to three post-translational modifications (citrullination, carbamylation and acetylation) (4). The cut-off for ELISA tests was established by ROC curves, with a specificity of 95% compared with a healthy population. The frequency and titers of the AMPA isotypes (IgA, IgG, IgM) was analyzed.

Results: 45 PR patients (77.6% female), with a mean age of 49.3 (\pm 11) years and a mean disease duration of 9.6 (\pm 6.1) months and 125 RA patients (75.6%

Table 1. Anti-CarP autoantibody status in RA vs PR patients.

		RA (n 125)	PR (n 45)	p value
Fetal calf serum carbamylated (FCS-CarP)	anti-FCS-CarP-IgG positive, n (%)	78 (62.4)	14 (31.1)	<0.005
	median titer, AU/mL (IQR)	238 (571)	75 (249)	<0.005
	anti-FCS-CarP-IgA positive, n (%)	41 (32.8)	2 (4.4)	<0.005
	median titer, AU/mL (IQR)	161 (308)	14 (97)	<0.005
Fibrinogen carbamylated (Fib-CarP)	anti-FCS-CarP-IgM positive, n (%)	30 (24.0)	5 (11.1)	NS
	median titer, AU/mL (IQR)	90 (165)	32 (101)	<0.005
	anti-Fib-CarP-IgG positive, n (%)	87 (69.6)	9 (20)	<0.005
	median titer, AU/mL (IQR)	249 (304)	70 (104)	<0.005
Chimeric fibrin/ filaggrin homocitrullinated peptide (CFFHP)	anti-Fib-CarP-IgA positive, n (%)	25 (20.0)	10 (22.2)	NS
	median titer, AU/mL (IQR)	0 (76)	36 (72)	<0.005
	anti-Fib-CarP-IgM positive, n (%)	33 (26.4)	8 (17.8)	NS
	median titer, AU/mL (IQR)	82 (117)	57 (84)	NS
Chimeric fibrin/ filaggrin homocitrullinated peptide (CFFHP)	anti-CFFHP-IgG positive, n (%)	54 (43.2)	10 (22.2)	<0.05
	median titer, AU/mL (IQR)	9 (227)	0 (12)	<0.005
	anti-CFFHP-IgA positive, n (%)	20 (16.0)	1 (2.2)	<0.05
	median titer, AU/mL (IQR)	0 (5)	0 (0)	NS
	anti-CFFHP-IgM positive, n (%)	14 (11.2)	2 (4.4)	NS
	median titer, AU/mL (IQR)	0 (7)	0 (0)	<0.05

females) with a mean age of 59.6 (± 13) years and a mean disease duration of 77.2 (± 59.7) months. RF and ACPA (CCP2) were positive in 80% and 91.1% of PR patients and 77.6% and 88% of RA patients ($p > 0.05$). Although both populations presented a similar frequency of RF and ACPA (CCP2), PR patients had fewer AMPA specificities than RA patients. The differences were statistically significant for two IgA ACPA antigens (doubly citrullinated/homocitrullinated peptides) and most anti-CarP specificities and isotypes (Table).

Conclusion: The immune response against post-translational modified peptides/proteins has a lower frequency and less isotype usage in PR for some AMPA specificities in comparison with RA. The absence of IgA ACPA isotypes and, especially, anti-CarP in the early stages of PR may be associated with a lower rate of progression to RA.

REFERENCES:

- [1] Cabrera-Villalba S et al. *Arthritis Res Ther* 2017
- [2] Castellanos-Moreira R et al. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2020.
- [3] Castellanos-Moreira R et al. *Ann Rheum Dis* 2020
- [4] García-Moreno et al. *Int.J.Mol.Sci* 2021

Acknowledgements: PALABA study investigators: Beatriz Frade-Sosa, Rosa María Morlà, Lola Tobalina, María López-Lasanta, Helena Borrell, Georgina Salvador, Andrea M Cuervo, Noemí Busquets, Eduard Graell, Carolina Pérez-García, Luciano Pocino, Delia Reina, Oscar Camacho, Hector Corominas Ana M Millan, Miquel Sala, Sonia Castell, Eduardo Kanterewicz, Josep R. Rodriguez Cros, Alejandro Escudero, Usansolo Irati, José Francisco García, Francisco Javier Toro, Natividad Oreiro, Alejandro Olivé, María J Gómara, Cristina García-Moreno, Isabel Haro and Raimon Sanmartí.

Disclosure of Interests: Cristina García-Moreno: None declared, Rosa Morlà: None declared, Beatriz Frade-Sosa: None declared, Lola Tobalina: None declared, María Jose Gomara: None declared, Raimón Sanmartí Speakers bureau: Received speaker honoraria from Abbvie, BMS, Gebro-Pharma, Lilly, MSD, Pfizer, Sanofi and Roche, Grant/research support from: investigation grants from Abbvie, BMS, Gebro-Pharma, Lilly, MSD, Pfizer, Sanofi and Roche, Isabel Haro: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3228

AB0193 BIOLOGIC DRUGS RETENTION IN ELDERLY RHEUMATOID ARTHRITIS: WHAT FEATURES?

S. Boussaid¹, K. Saadaoui¹, S. Jemmal¹, M. Hassayoun¹, S. Reki¹, S. Rahmouni¹, H. Sahli¹, M. Elleuch¹. ¹Hospital Rabta, rheumatology, Tunis, Tunisia

Background: The elderly RA population is expanding. The management of RA in elderly patients can be challenging because of comorbidities, the frequency of adverse events. The efficacy and safety of RA therapies; particularly biologics drugs (bDMARDs); are poorly studied in this age group.

Objectives: To investigate the therapeutic response to bDMARDs in elderly rheumatoid arthritis.

Methods: We conducted a cross-sectional and observational study. Files of patients with RA on biologics drugs (archived from the files of patients on the National Health Insurance Fund of Tunis) were studied. The characteristics of RA, and the current treatments were studied. We have divided our population into two age groups. G1 aging under 65 years and G2 aged 65 or over. The therapeutic maintenance rate as well as the biologics survival was analyzed using Kaplan-Meier survival curves and compared using the Log-Rank test.

Results: Three hundred and seventy-four files were selected. Their average age was 55 \pm 12.54 years [20-90]. A female predominance was noted with a sex ratio M/F=0.147. The average duration of RA was 11.7 \pm 6.76 years [2-41]. Subjects over the age of 65 represented 22.2% of the workforce, i.e. 83 patients. The first bioterapy prescribed was etanercept in 54% of cases, adalimumab in 14% of cases, certolizumab pegol 13%, infliximab 6%, tocilizumab 6% and rituximab in 7% of cases. The 4-year survival was 54.41% and 60.94% for subjects under 65 and 65 or older, respectively. Treatment maintenance for RA in the elderly (≥ 65 years old) was 42.21 months, [53.51-46.92]. In our study, age did not influence the survival of biologics with a Hazard Ratio (HR) = 0.997 ($p=0.667$).

Conclusion: RA therapy is generally effective and safe in elderly patients. We did not find any influence of age on survival and therapeutic maintenance of biological treatments. Further studies with a broader spectrum are needed to better understand this notion

Disclosure of Interests: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3234

AB0194 VALIDATION OF ANDROID OPERATED SMARTPHONE PEDIOMETER IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

S. R. Wagner¹, R. B. Gregersen¹, L. Henriksen¹, E. M. Hauge^{2,3}, K. K. Keller^{2,3}. ¹Aarhus University, Department of Electrical and Computer Engineering, Aarhus, Denmark; ²Aarhus University, Department of Clinical Medicine, Aarhus, Denmark; ³Aarhus University Hospital, Department of Rheumatology, Aarhus, Denmark

Background: Impact of disease and disease activity in RA is measured with questionnaires such as the health assessment questionnaire (HAQ) or composite scores such as the disease activity score (DAS-28). These methods may miss signs of disease activity because they are typically performed only at hospital visits. Measuring physical activity continually may assist in the early discovery of relapses in the future. In addition, measuring physical activity may be relevant for predicting the risk of developing comorbidities such as cardiovascular disease [1]. Activity tracker devices have been tested in RA patients for this purpose, but the disadvantage is that they can only be carried for a limited period of time and are expensive, which makes them unsuitable for long-term cohort studies [2]. As an alternative, obtaining physical activity data from the patient's own smartphone using a dedicated and secure activity tracker app incurs no added costs, but the reliability of this method has never been tested in patients with RA.

Objectives: The aim of this study was to validate the use of the standard Android-operated smartphone step-counter pedometer in patients with RA.

Methods: Clinical characteristics were obtained. Two typical Android smartphones running the Android virtual step counter sensor were tested in a treadmill test-bed setup at 6 different speeds, ranging from 2.5 km/h to 5 km/h. Patients walked 100 steps at each test speed wearing the Android devices placed in a stomach pouch. Software running on a Windows PC communicated in real time with both phones, and the PC software also allowed the investigator to easily record the manually observed steps using clicker functionality, which were then automatically linked to the steps recorded from the smartphones.

Results: Median (interquartile range) disease duration was 13 (4-21) years, DAS-28 2.2 (1.6-2.9), and MHAQ 0.2 (0-0.9). Seventy-six % of the patients were rheumatoid factor positive, 75% were Anti-citrullinated peptide antibody positive, and 70% had erosive disease.

The overall difference in device step counts versus the observed was 5.9% mean average percentage error for both devices. Most of the error was introduced at the 2.5 km/h speed tests where the mean error of the two devices was 18.5%. From 3 km/h, the mean average percentage error of the two devices was below 5% and from 3.5 km/h and up the mean average percentage error of the two devices was below 3%. A box plot of the data is demonstrated in Figure 1.

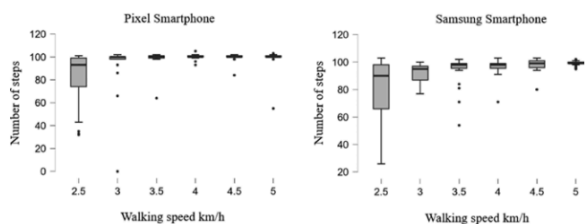


Figure 1. Box plot of number of steps with both devices at the six different speeds.

Both walking speed and walking cadence had a significant impact on the pedometer validity, as both speed and cadence were negatively correlated to the absolute percent error measured by both devices ($p < 0.001$), which indicates, that the greater the speed and/or cadence, the lower the step counting error rate.

Conclusion: The two tested Android pedometer applications were valid in patients with rheumatoid arthritis, but walking with very low speed may represent a challenge. Next step will be field tests evaluating the setup including active measured time in patients with rheumatoid patients.

REFERENCES:

- [1] Metsios GS, Kitis GD. Physical activity, exercise and rheumatoid arthritis: Effectiveness, mechanisms and implementation. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018;32:669-82.
- [2] O'Brien CM, Duda JL, Kitis GD, et al. Measurement of sedentary time and physical activity in rheumatoid arthritis: an ActiGraph and activPAL™ validation study. *Rheumatol Int* 2020;40:1509-18.

Disclosure of Interests: Stefan Rahr Wagner: None declared, Rasmus Bøge Gregersen: None declared, Line Henriksen: None declared, Ellen-Margrethe Hauge Speakers bureau: bbVie, Sanofi, Sobi, MSD, UCB, Consultant of: bbVie, Sanofi, Sobi, MSD, UCB, Grant/research support from: Novo Nordic Foundation, Roche, Novartis, Kresten Krarup Keller: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.3238

AB0195 PLATELET TO LYMPHOCYTE RATIO: A BIOMARKER OF STRUCTURAL DAMAGE IN RHEUMATOID ARTHRITIS

E. Maatoug^{1,2}, M. Slouma^{2,3}, R. Dhahri^{2,3}, O. Beskri^{2,3}, I. Gharsallah^{2,3}, L. Metoui^{2,3}, B. Louzir^{2,4}. ¹Military hospital of Tunis, Department of Radiology, Tunis, Tunisia; ²University of Tunis El Manar, Faculty of Medicine of Tunis, Tunisia; ³Military hospital of Tunis, Department of Rheumatology, Tunis, Tunisia; ⁴Military hospital of Tunis, Department of Internal Medicine, Tunis, Tunisia

