



Autoanticuerpos para diagnóstico y pronóstico en artritis reumatoide: inmunoensayo cubano con péptido citrulinado del fibrinógeno

Goitybell Martínez Téllez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-6679-1410>

Bárbara Torres Rives¹ <https://orcid.org/0000-0001-9729-5172>

Vicky Sánchez Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5332-6413>

Maité Martiatu Hendrich¹ <https://orcid.org/0000-0002-0117-4665>

Cira Rodríguez Pelier¹ <https://orcid.org/0000-0003-3920-0299>

¹ Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: goity@infomed.sld.cu

RESUMEN

Palabras clave

artritis reumatoide; anticuerpos contra péptidos citrulinados; fibrinógeno

Introducción: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos. Objetivo: desarrollar inmunoensayos cubanos para determinar anticuerpos y evaluar la utilidad de anticuerpos contra un péptido del fibrinógeno citrulinado para diagnóstico y valoración clínico terapéutica de pacientes con AR.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles. Participaron 162 pacientes con AR, 112 pacientes con otras enfermedades y 50 individuos sanos. Se evaluó el desempeño analítico y diagnóstico de un inmunoensayo novedoso para determinar anticuerpos contra un péptido del fibrinógeno citrulinado diseñado mediante informática, de factor reumatoide y anticuerpos antiqueratina. Se determinaron mediante inmunoensayos comerciales los anticuerpos factor reumatoide, antipéptidos citrulinados de segunda generación, anti vimentina citrulinada mutada, anti vimentina carbamilada y antiqueratina. Se realizó un estudio longitudinal con 60 pacientes con AR temprana. Se determinaron los anticuerpos, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular, índice de actividad y respuesta al metotrexato a los seis meses. **Resultados:** Se introdujeron en la práctica 3 inmunoensayos. El desempeño diagnóstico de los anticuerpos contra el péptido del fibrinógeno citrulinado fue superior a los inmunoensayos comerciales más utilizados, con un costo por paciente inferior (5,52 CUC) a los anticuerpos de segunda generación (14,00 CUC). Los pacientes con estos anticuerpos, tuvieron mayor riesgo para mayor actividad (riesgo=0,96; p=0,0424) y baja respuesta al tratamiento (riesgo = 0,82; p = 0,0402). La determinación de anticuerpos contra un péptido novedoso del fibrinógeno citrulinado tiene menor costo y gran utilidad para el diagnóstico y evaluación clínico terapéutica en la AR.

Autoantibodies for diagnostic and prognostic in rheumatoid arthritis: Cuban immunoassay with citrullinated fibrinogen peptide

ABSTRACT

Keywords

rheumatoid arthritis; antibodies against citrullinated peptides; fibrinogen

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and inflammatory disease characterized by presence of autoantibodies. Objective: to develop Cuban immunoassays to determine antibodies and evaluate the usefulness of antibodies against a citrullinated fibrinogen peptide for diagnosis and therapeutic clinical assessment of patients with RA. **Methods:** A case-control study was conducted. Participants were 162 patients with RA, 112 patients with other diseases and 50 healthy individuals. The analytical and diagnostic performance of a novel immunoassay was evaluated to determine antibodies against a citrullinated fibrinogen peptide designed by computer, rheumatoid factor and antikeratin antibodies. Commercial rheumatoid factor antibodies, second generation citrullinated peptides, mutated citrullinated vimentin, carbamylated vimentin and antikeratin were determined by commercial immunoassays. A longitudinal study was conducted on 60 patients with early RA. Antibodies, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, activity index and response to methotrexate after six months were determined. **Results:** Three immunoassays were introduced into practice. The diagnostic performance of the antibodies against the citrullinated fibrinogen peptide was superior to the most commonly used commercial immunoassays, with a lower cost per patient (5,52 CUC) than the second-generation antibodies (14,00 CUC). Patients with these antibodies had a higher risk for greater activity (risk = 0,96; p = 0,0424) and low response to treatment (risk = 0,82; p = 0,0402). The determination of antibodies against a novel citrullinated fibrinogen peptide has lower cost and great utility for the diagnosis and therapeutic clinical evaluation in RA.

INTRODUCCION

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad caracterizada por inflamación crónica y presencia de autoanticuerpos^(1,2,3). Aunque no se han determinado los factores primarios que desencadenan la AR, existen evidencias que indican que la inflamación sinovial, ocurre probablemente como resultado de complejas interacciones medioambientales y genéticas^(4,5,6).

El diagnóstico de la AR se realizaba mediante los criterios del Colegio Americano de Reumatología de 1988, que establecen seis criterios clínicos y la determinación de los anticuerpos factor reumatoide (FR) como único criterio serológico⁽⁷⁾.

Debido a la vinculación de las proteínas citrulinadas con los mecanismos patogénicos de la AR^(1,5,8). La determinación de anticuerpos que reconocen estos antígenos proteicos, se ha incluido en los nuevos criterios para el diagnóstico de esta enfermedad, establecidos en el 2010 por el Colegio Americano de Reumatología y la Liga Europea contra el Reumatismo⁽⁹⁾.

En diversos estudios se ha demostrado que estos anticuerpos que reconocen proteínas citrulinadas, se presentan en etapas tempranas de la enfermedad, tienen un elevado valor para el diagnóstico, con una alta especificidad, ya que son capaces

de diferenciar pacientes con AR de pacientes con otras artropatías, además de ser predictivos de la erosión articular^(9,10,11).

Los primeros anticuerpos contra péptidos citrulinados descritos fueron el factor perinuclear y los anticuerpos antiqueratina (AKA)⁽¹²⁾. Actualmente uno de los ensayos más utilizados es la determinación de anticuerpos contra péptidos citrulinados de segunda generación (anti-CCP2), que además de su alta especificidad, se presentan en etapas tempranas⁽¹²⁾.

En estudios más recientes, se han detectado proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de las articulaciones inflamadas de pacientes con AR como vimentina, enolasa, fibronectina, colágeno tipo II, fibrinógeno y fibrina⁽¹³⁾. Estas proteínas son consideradas candidatos relevantes para el desencadenamiento de la autoinmunidad y su utilización para la determinación de anticuerpos en pacientes con AR, puede conllevar a un incremento en el valor diagnóstico de los inmunoensayos utilizados en la actualidad^(13,14).

También se han descrito en los pacientes con AR, anticuerpos que reaccionan con proteínas modificadas por carbamylación, otra modificación postraduccional vinculada a los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad⁽¹⁵⁾. En Latinoamérica, no existen estudios que demuestren el uso de anticuerpos contra antígenos carbamylados.

Existe un creciente interés por desarrollar pruebas específicas que mejoren el diagnóstico de la AR, que permitan además su diferenciación temprana respecto a otras enfermedades reumáticas que afectan a las articulaciones y el tejido conectivo, sobre todo en pacientes con un peor pronóstico, así como la evaluación de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Además el tratamiento adecuado, con un control periódico de la actividad inflamatoria de la enfermedad, contribuye a mejorar el pronóstico de la AR ⁽¹⁶⁾.

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar inmunoensayos cubanos para determinar anticuerpos en la AR y evaluar la utilidad de un inmunoensayo para determinar anticuerpos que reconocen un péptido novedoso del fibrinógeno citrulinado (anti-PFC), para el diagnóstico y valoración clínica terapéutica de pacientes con AR en nuestro país.

MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio analítico observacional de casos y controles con 162 pacientes (81 con AR temprana y 81 con AR establecida), mayores de 18 años, del Centro de Reumatología y que cumplieron los criterios del CAR/EULAR (9). Se excluyeron pacientes con neoplasias y gestantes. Participaron además 50 individuos sanos y 112 individuos con otras enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes (26 pacientes con sintomatología, pero sin diagnóstico definitivo de AR, 20 con enfermedad mixta del tejido conectivo, 20 con hepatitis virales crónicas, 18 con lupus eritematoso sistémico, 8 con esclerodermia, 6 con artritis psoriásica, 6 con espondilo artropatías, 6 con miositis autoinmune y 2 con síndrome de Sjögren) del Centro Nacional de Genética Médica de Cuba (CNGM). La investigación fue aprobada por el comité de ética del CNGM y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

En un diseño longitudinal prospectivo, 60 pacientes con AR temprana sin tratamiento se reevaluaron a los seis meses de implementado el tratamiento con metotrexato para medir la utilidad de los anticuerpos anti-PFC para medir la evolución clínica y la respuesta terapéutica.

Determinación de los indicadores clínicos

Se determinó la velocidad de sedimentación globular (VSG) en 2 mL de sangre anticoagulada con 0,5 mL de citrato de sodio (3,8%), en 1 hora. La proteína C reactiva se determinó mediante la técnica cualitativa de aglutinación en látex (Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, EUA). Se calculó el indicador clínico de actividad de la enfermedad basado en el conteo de 28 articulaciones (DAS 28) con la VSG ⁽¹⁷⁾. Se consideró DAS 28 en remisión (DAS 28 <2,6), DAS 28 baja actividad (DAS 28 \geq 2,6 y \leq 3,2), moderado (DAS 28 >3,2 y \leq 5,1) y elevado

(DAS 28 >5,1) y los criterios de mejoría clínica de 20 %, 50 % y 70 % y de respuesta al tratamiento del CAR ⁽¹⁸⁾.

Diseño y obtención del péptido citrulinado del fibrinógeno

Se realizó la predicción de determinantes antigénicos de las cadenas α y β del fibrinógeno, en la estructura tridimensional de la proteína obtenida del banco de datos RSCB-PDB-101, utilizando los programas informáticos BepiPred 1.0 y Discotope 1.2. Se seleccionaron 2 péptidos del fibrinógeno se unieron mediante enlace covalente con un aminoácido cisteína intermedio y con la ubicación de una cisteína final y la sustitución de la terminación carboxílica terminal de la cisteína por carboxamida terminal. Las dos subunidades peptídicas fueron citrulinadas en dos residuos de arginina. Se realizó la síntesis en fase sólida mediante la metodología Fmoc/tBu (9-fluorenilmetiloxycarbonilo/tert-butilo).

La purificación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) preparativa en un equipo LabChrom (Merck Hitachi, Alemania). El grado de pureza se determinó mediante RP-HPLC analítica en el equipo AKTA 100 (GE Healthcare, EUA). La determinación de la masa molecular se realizó mediante espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización (ESI-MS), en un espectrómetro Q-ToF (Micromass, Inglaterra).

Determinación de autoanticuerpos

La determinación de anticuerpos anti-PFC de tipo IgG, se realizó mediante un ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) de tipo indirecto. Se sensibilizaron las placas de máxima absorción de 96 pocillos (Thermo scientific, Dinamarca) con el péptido del fibrinógeno a la concentración de 10 μ g/mL en solución amortiguadora fosfato salina 0,15M, pH = 7,2 (PBS). Se incubó 16 h en cámara húmeda de 20 °C a 25 °C. Se lavó 3 veces con PBS y *Tween* 20 al 0,05 % en un lavador de micro ELISA (SUMA, Cuba) añadiendo 200 μ L en cada pocillo. Se adicionó albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA, USA) diluida al 2 % en PBS, se incubó 1 h en cámara húmeda de 20 °C a 25 °C y se realizó el lavado nuevamente.

Los controles positivo y negativo se prepararon a partir de pacientes con AR e individuos sanos respectivamente y se añadieron al igual que las muestras diluidas 1/100 en PBS, BSA 2 % y Tween 20 al 0,05 %. Se adicionó el suero estándar desde 120 U/mL hasta 6,2 U/mL, preparado a partir del suero de pacientes con AR, cuya concentración fue evaluada con respecto al suero estándar del ensayo anti-CCP2 (IBL, Alemania). Se incubó de 20 °C a 25°C durante 1 h en cámara húmeda. Luego de otro paso de lavado se añadió el conjugado anti IgG con peroxidasa (Dako cytometry, Dinamarca) 100 μ L en cada pocillo a la dilución sugerida para el re-

activo (1/6000), en PBS, Tween 20 al 0,05 %. Se incubó 1h de 20 °C a 25 °C y se lavó la placa. Se añadió el sustrato dihidrocloruro de orto fenilendiamina (SIGMA, EUA) 1 mg/mL diluido en la disolución amortiguadora citrato de sodio 0,1 mol/L, PH 5,5 con peróxido de hidrogeno 1 mg/mL (MERCK, Alemania). Se incubó 30 min a una temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$. La reacción se detuvo por la adición de 50 μL de ácido sulfúrico 3 mol/L (MERCK, Alemania) en agua y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA PR-521 (SUMA, Cuba). Se utilizó un ajuste logarítmico para la curva de calibración.

De manera similar se realizó la determinación de FR IgM e IgA utilizando IgG de conejo (CENPALAB, Cuba) en el recubrimiento de las placas.

Los AKA se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta con cortes de esófago de ratas.

La determinación de anticuerpos con ELISA comerciales fue anti vimentina citrulinada mutada IgG (anti-MCV), FR IgM e IgA y anti vimentina carbamylada IgM (anti-VIMCARB) de Orgentec, Alemania, así como anti-CCP2 de IBL International, Alemania.

Se determinó el desempeño analítico teniendo en cuenta los requisitos establecidos en las regulaciones establecidas por el Centro para el Control Estatal de los Medicamentos (CECMED) ^(19,20).

Análisis estadístico

Se utilizaron los programas Statistica 7.0 y EPIDAT 3.1. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia y porcentajes. Se calculó el estadígrafo χ^2 , con prueba exacta de Fisher, para valores esperados inferiores a 5 y se estimó el Odd Ratio (OR) como magnitud de asociación. Se determinaron las diferencias entre las densidades ópticas de los controles mediante el estadígrafo t de Student. Las variables cuantitativas con distribución diferente a la normal se expresaron como mediana y recorridos intercuartiles. Se realizó la comparación de las variables cuantitativas entre grupos con U de Mann Whitney. Para la correlación se determinó el coeficiente de Spearman. Para determinar el valor diagnóstico se realizaron las tablas de contingencia para el total de pacientes con AR, con respecto a los individuos sanos y pacientes con otras enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias e infecciosas crónicas. De igual manera se realizó por separado para el grupo de pacientes con AR temprana y para el grupo de pacientes con AR establecida.

Se calcularon la sensibilidad y especificidad diagnósticas, así como los valores predictivos positivo y negativo. Se determinó el índice de Youden (IY) y el área bajo la curva operativa del receptor (ROC). Para determinar la relación entre la presencia de anticuerpos y la evolución clínico terapéutica al tratamiento con metotrexato, se determinó el riesgo, el esta-

dígrafo Chi cuadrado de asociación El nivel de significación estadística empleado fue 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Predicción de epítomos de la proteína fibrinógeno y diseño de un péptido citrulinado

El péptido citrulinado del fibrinógeno fue sintetizado químicamente, mediante unión covalente con un aminoácido cisteína de los epitopes de la cadena α (secuencias de aminoácidos de 210 a 220, con citrulinación en 216) y de la cadena β (secuencias de aminoácidos de 45-55, con citrulinación en 47) de la proteína, que fueron citrulinadas en dos residuos de arginina. La secuencia de aminoácidos fue KDLLPS citrulina DRQHCGH citrulina PLDKKREEC, cubriendo el 1,9 % de la cadena α (11 /560 aminoácidos) y cubriendo el 2,4 % de la cadena β (11/461) del fibrinógeno.

La secuencia de aminoácidos seleccionada fue Lys Asp Ile Ile Pro Ser citrulina Asp Arg Gln His citrulina Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Cys (KDLLPS citrulina DRQHCGH citrulina PLDKKREEC), cubriendo el 1,9 % de la cadena α del fibrinógeno (11/560 aminoácidos) y cubriendo el 2,4 % de la cadena β del fibrinógeno (11/461). El péptido diseñado tuvo una carga neta positiva (2+), un balance arginina/citrulina de 1, una masa molecular de $2916,46 \pm 0,02$ Da que coincidió con la masa molecular teórica 2916,46 Da y una pureza de 98,3.

Desarrollo de los inmunoensayos

Para el desarrollo de los inmunoensayos anti-PFC, FR IgM e IgA y AKA se seleccionaron como condiciones óptimas aquellas donde se obtuvo la mayor discriminación entre las densidades ópticas de un suero control positivo conformado por muestras de suero de pacientes con AR y un suero control negativo formado por muestras de suero de individuos sanos, tal como se ha planteado para el desarrollo de inmunoensayos ⁽²¹⁾.

Desempeño analítico de los inmunoensayos

Se demostraron los requerimientos analíticos según las regulaciones del CECMED ⁽²⁰⁾, ⁽¹⁹⁾. Para los métodos cuantitativos: sensibilidad, precisión, exactitud y especificidad, para los anticuerpos anti-PFC en un rango de 6,2 a 100 U/mL (valor de corte = 40 U/mL) y para los anticuerpos FR IgM (valor de corte = 40) e IgA (valor de corte = 40) en un rango de 5 a 500 U/mL. Para la determinación cualitativa AKA se demostró precisión y especificidad.

Desempeño diagnóstico de los inmunoensayos

Los anticuerpos que reconocen proteínas de la vimentina y el fibrinógeno (anti-VIMCARB, anti-MCV, anti-PCF) tuvieron mayor valor diagnóstico, con mayor área bajo la curva ROC

(figura 1). Es importante la capacidad de estos antígenos modificados presentes en las articulaciones como el fibrinógeno, para la producción de autoanticuerpos⁽¹³⁾. El desempeño diagnóstico de los anticuerpos anti-PFC fue superior a los inmunoensayos comerciales más utilizados (factor reumatoide y anti péptidos citrulinados de segunda generación (figura 1). Las determinaciones de FR desarrolladas en el laboratorio tuvieron superior desempeño diagnóstico a los respectivos ensayos comerciales.

En la AR temprana, la determinación de anticuerpos anti-VIMCARB fue el inmunoensayo de mayor valor diagnóstico, para el cual se observó la mayor área bajo la curva ROC, seguido de los anticuerpos anti-PFC (figura 2).

Otros investigadores plantean que el fibrinógeno citrulinado puede ser importante en la AR, porque los anticuerpos que reconocen estos péptidos, tienen mayor sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad que otros ACPC y un desempeño diagnóstico similar a los anti-CCP2⁽²²⁾.

El análisis de los indicadores diagnósticos de los inmunoensayos de determinación de anticuerpos en los pacientes con AR se muestra en la tabla 1.

En el 2014, Cornillet y col. evaluaron el reconocimiento de ACPC de un péptido de la cadena β de la fibrina citrulinada (60-74, citrulinación 60, 72, 74), con una sensibilidad (71 %) y especificidad (95 %), similares a la obtenida para los anticuerpos anti-CCP2 (74 % sensibilidad y 95 % de especificidad) en la misma población⁽²³⁾. Demostraron además que estos epítotos de la fibrina son reconocidos por anticuerpos contra el fibrinógeno citrulinado. Estudiaron además la reactividad de epítotos de la fibrina frente a ACPC, mediante la combinación

de un péptido citrulinado de la cadena α de la fibrina (36-50) y un péptido citrulinado de la cadena β (60-74)⁽²³⁾. En este estudio se obtuvo una sensibilidad de 47 %, al fijar la especificidad diagnóstica a 98 %⁽²³⁾.

En otros estudios se observó una especificidad de 98 % y sensibilidades similares (47 % a 48 %) de la mezcla de un péptido citrulinado de la cadena α del fibrinógeno (36-50) y uno de la cadena β (60-74)⁽²⁴⁾.

Por otra parte, se ha planteado que el rango de sensibilidades para los anticuerpos anti-CCP2 se encuentra entre 41 % y 88 % y la especificidad entre 90 % y 99 %^(25,26). En las investigaciones realizadas en Latinoamérica con anticuerpos anti-CCP2, el rango varía tanto para la sensibilidad (61,8 % a 97,6 %) como para la especificidad (52,5 %-97,0 %)^(4,11,14).

Estudios previos han demostrado que los anticuerpos anti-MCV constituyen una herramienta diagnóstica de gran utilidad, especialmente en la AR temprana y en pacientes seronegativos de anti-CCP2⁽¹¹⁾.

Por otra parte, observamos en este estudio un mayor valor diagnóstico determinado de los anticuerpos anti-MCV con respecto a los anticuerpos anti-CCP2, lo que está en concordancia con lo observado por Díaz-Tozcano y col.⁽¹¹⁾.

La sensibilidad de la anticuerpos anti-VIMCARB en los pacientes cubanos con AR observada en este estudio, fue superior a la observada en un estudio realizado por Ospelt y col. (50 %), con anticuerpos contra proteínas carbamiladas⁽¹⁵⁾.

Se ha observado en otros estudios que la determinación de FR IgM tiene una sensibilidad de 60 % a 80 % y una especificidad de 50 % a 85 % para el diagnóstico de la AR⁽²⁷⁾.

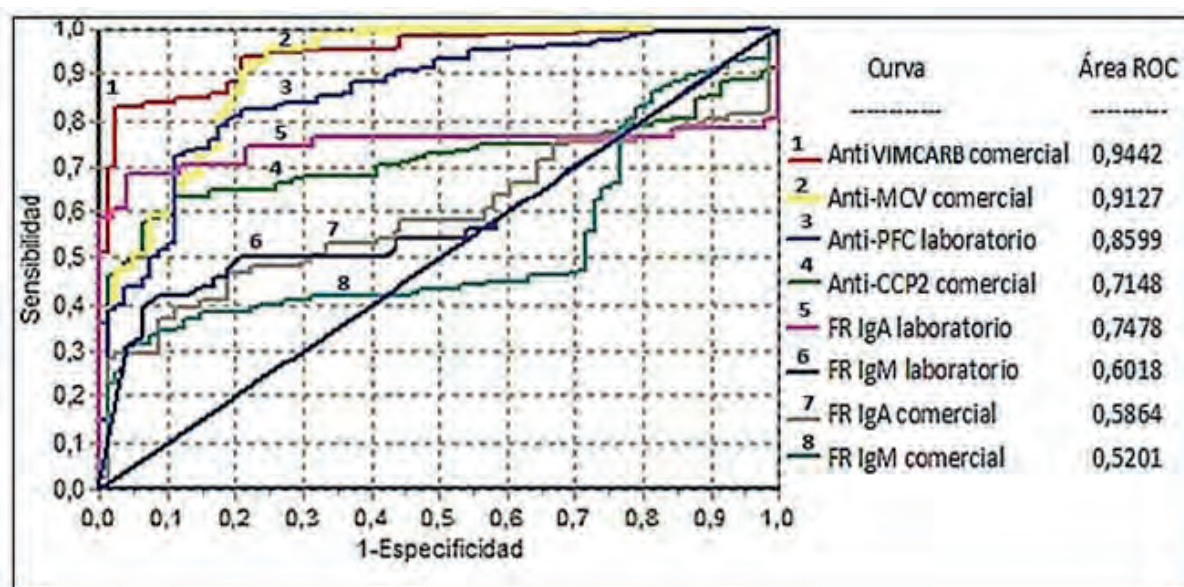


Fig. 1. Desempeño diagnóstico de los métodos de determinación de autoanticuerpos. ROC: curva operativa del receptor, VIMCARB: vimentina carbamilada, MCV: vimentina citrulinada mutada, PFC: péptido del fibrinógeno citrulinado, CCP2: péptidos citrulinados de segunda generación, FR: factor reumatoide, Ig: inmunoglobulina. La prueba de homogeneidad de áreas mostró diferencias entre todas las curvas ROC ($p = 0,000$).

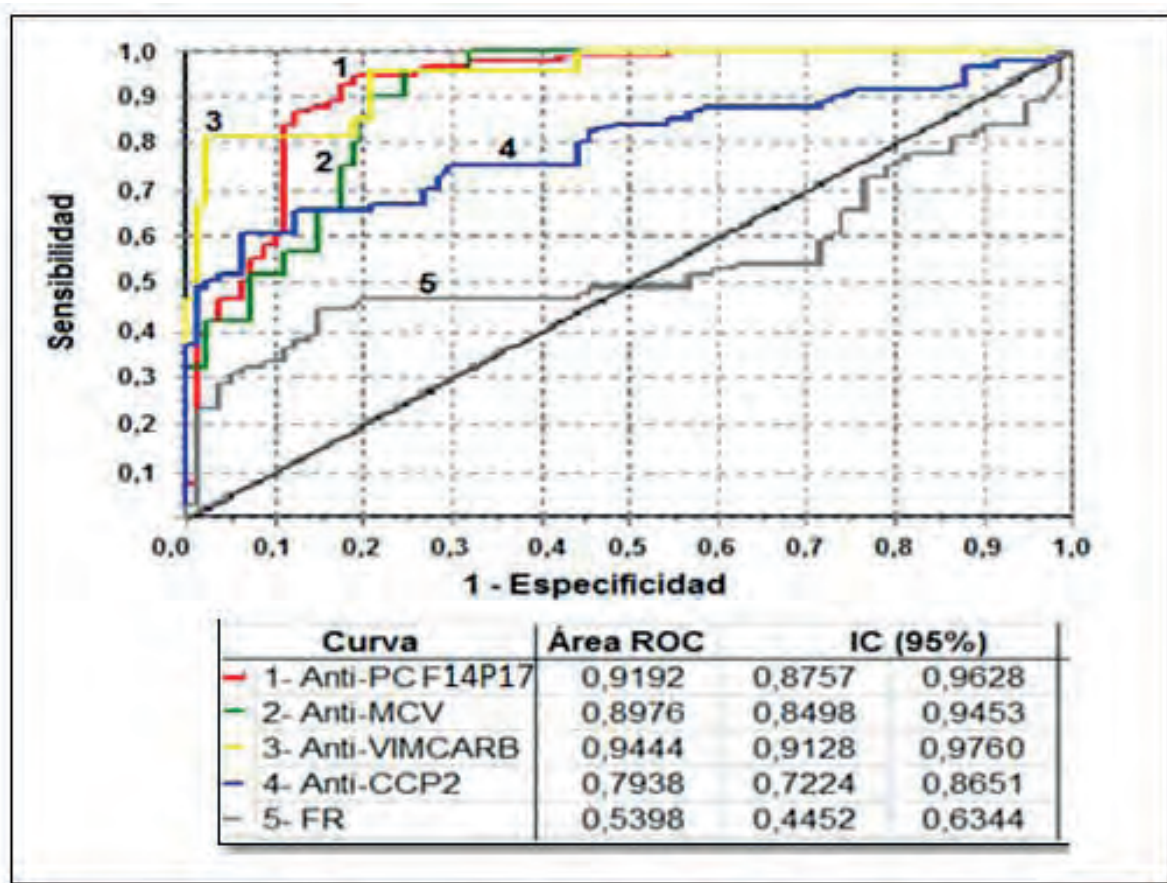


Fig. 2. Análisis de las curvas ROC obtenidas durante la evaluación del desempeño diagnóstico de los inmunoensayos en la AR temprana. ROC: curva operativa del receptor. Anti-PFC: anti péptido citrulinado del fibrinógeno. Anti-MCV: anti-vimentina citrulinada mutada. Anti-VIMCARB: anti vimentina carbamílada. Anti-CCP 2: anti péptidos citrulinados de segunda generación. FR: factor reumatoide. IC: intervalo de confianza. La prueba de homogeneidad de áreas mostró diferencias entre todas las curvas ROC ($p = 0,000$).

Por su parte los AKA han demostrado una alta especificidad para el diagnóstico de la AR, con la desventaja de que es una técnica cualitativa y se dificulta la obtención del sustrato⁽²⁸⁾.

Características demográficas y clínicas de los pacientes y relación con los anticuerpos anti-PCF

Los pacientes incluidos en el grupo de AR temprana tuvieron una mediana de edad de 48 años (39 a 53). De estos, 60 pacientes fueron recién diagnosticados y 21 pacientes tuvieron una mediana de duración de la enfermedad a partir del diagnóstico, de 7 meses (5 a 12) La mediana de edad en los pacientes con AR establecida fue de 51 años (44 a 61), con una mediana de duración de la enfermedad de 5 años (2 a 10). La frecuencia del sexo femenino fue elevada en la AR temprana (76,5 %) y establecida (82,7 %).

La mediana de la edad en los pacientes con AR establecida fue de 51 años en un rango desde 44 a 61 años y con una mediana de duración de la enfermedad de 5 años en un rango de 2 a 10 años. Se observó una frecuencia elevada del sexo

femenino tanto en el grupo de pacientes con AR temprana (76,5 %), como en el grupo de pacientes con AR establecida (82,7 %).

En la figura 3 se muestra el estudio de correlación entre los anticuerpos anti-PFC y los indicadores clínicos y serológicos de actividad de la enfermedad. En la AR temprana se observó correlación positiva de los anticuerpos anti-PFC con el DAS 28 ($r = 0,2714$; $p = 0,0142$) y el FR ($r = 0,299$; $p = 0,0066$). En la AR establecida se observó correlación para los anticuerpos con valor pronóstico anti-CCP2 ($r = 0,5050$; $p = 0,0000$) y FR ($r = 0,4074$; $p = 0,0002$) con los anticuerpos anti-PFC. Se observó que la presencia de proteína C reactiva estuvo asociada a la presencia de estos anticuerpos en los pacientes con AR temprana ($\chi^2 = 5,8$; OR = 4,7; IC = 1,2-17,9; $p = 0,0163$) y en los pacientes con AR establecida ($\chi^2 = 5,3$; OR = 2,9; IC = 1,2-7,4; $p = 0,0217$).

De los pacientes con AR temprana incluidos en el estudio 60 fueron recién diagnosticados, vírgenes de tratamiento y 21 pacientes ya tenían tratamiento con metotrexato en el momento de la inclusión.

Tabla 1. Desempeño diagnóstico de los métodos de determinación de anticuerpos en los pacientes con AR

Método	Sensibilidad (%); IC	Especificidad (%); IC	VPP (%); IC	VPN (%); IC
Anti-PFC laboratorio	72,2;	88,9;	92,9;	61,5;
	65,0-79,4	81,4-96,4	88,0-97,8	52,3-70,8
Anti-VIMCARB comercial	84,0;	90,1;	89,5;	84,9;
	78,0-89,9	85,2-95,0	84,3-94,7	79,2-90,5
Anti-MCV comercial	84,0;	88,9;	93,8;	73,5;
	78,0-89,9	81,4-96,4	89,5-98,1	64,2-82,7
Anti-CCP2 comercial	51,2;	98,8;	98,8;	50,3;
	43,2-59,2	95,7-100,0	95,9-100,0	42,2-58,4
FR IgM comercial	51,9;	85,2;	87,5;	46,9;
	43,9-59,9	76,8-93,5	80,4-94,6	38,5-55,4
FR IgA comercial	74,1;	66,7;	69,0;	72,0;
	63,9-84,2	55,8-77,6	58,7-79,3	61,2-82,8
FR IgM laboratorio	50,0;	75,0;	66,7;	50,0;
	34,8-65,2	61,7-88,3	49,9-83,5	39,5-60,5
FR IgA laboratorio	68,3;	79,2;	73,8;	76,7;
	58,8-77,9	70,8-87,6	67,5-80,1	67,37-86,0
AKA comercial	94,0;	92,5;	94,0;	92,5;
	88,9-99,2	86,1-98,9	88,9-99,1	86,1-98,9
AKA laboratorio	95,0;	95,0;	95,9;	93,8;
	90,2-99,7	89,6-100,0	91,6-100,0	88,0-99,7

AR: artritis reumatoide, VIMCARB: vimentina carbamilada, MCV: vimentina citrulinada mutada, PFC: péptido del fibrinógeno citrulinado, CCP2: péptidos citrulinados de segunda generación, AKA: anticuerpos antiqueratina, FR: factor reumatoide, Ig: inmunoglobulina, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, IC: Intervalo de confianza del 95 %.

Todos los pacientes con AR temprana sin tratamiento, luego de la inclusión en el estudio fueron tratados con metotrexato a una dosis de 7,5 mg semanales por kilogramo de peso. La dosis se mantuvo o fue incrementada hasta alcanzar una dosis máxima de 25 mg semanales.

Se utilizó prednisona en todos los pacientes a dosis de 10 mg diarios, durante los tres primeros meses del tratamiento, según la evaluación del reumatólogo.

De los pacientes con AR establecida, el 81,5 % tenían tratamiento con metotrexato y el 35,8 % se encontraban con otros FAME como monoterapia o en combinación con metotrexato, como segundo escalón terapéutico en el momento de inclusión en el estudio.

Evolución clínica, respuesta al tratamiento con metotrexato y anticuerpos anti-PFC en los pacientes con la enfermedad temprana

Se ha recomendado que en los pacientes con AR, seis meses sea el tiempo mínimo de tratamiento para determinar la respuesta clínica, aunque a los 3 meses se pueden hacer valoraciones si no existe ninguna mejoría ⁽²⁹⁾.

Los pacientes con AR temprana tratados con metotrexato que presentaron anticuerpos anti-PFC al inicio del tratamiento tuvieron mayor riesgo (0,96) de tener actividad clínica de la enfermedad moderada o elevada (DAS 28 mayor de 3,2) a los seis meses de tratamiento, que aquellos pacientes seronegativos de estos anticuerpos (riesgo = 0,78). El riesgo relativo observado fue 1,23 (IC = 0,9-1,8) y se demostró que la existencia de actividad clínica de la enfermedad moderada o elevada (DAS 28 mayor de 3,2) en los pacientes con AR temprana a los seis meses de tratamiento con metotrexato, puede estar asociada a la presencia de anticuerpos anti-PFC al inicio del tratamiento ($\chi^2 = 4,1$; OR = 7,0; IC = 0,9-58,0; $p = 0,0424$).

Además se observó un mayor riesgo de tener actividad clínica moderada o elevada (riesgo = 0,92), para los pacientes con concentraciones de anticuerpos anti-PFC iguales o mayores a 40 U/mL al inicio del tratamiento, que en aquellos pacientes seronegativos de estos anticuerpos o con concentraciones inferiores a 40 U/mL. El riesgo relativo fue 1,35 (IC = 1,00-1,82) y se demostró asociación entre la presencia de anticuerpos anti-PFC a concentraciones iguales o mayores a 40 U/mL al inicio del tratamiento y la actividad clínica mode-

rada o elevada (DAS 28 mayor de 3,2) a los seis meses de tratamiento con metotrexato y ($\chi^2 = 4,1$; OR = 5,4; IC = 1,2-23,9; $p = 0,0417$).

Los pacientes con AR temprana que presentaron anticuerpos anti-PFC al inicio del tratamiento tuvieron mayor riesgo (riesgo = 0,82) de no tener respuesta o tener una baja respuesta (mejoría clínica igual o inferior al 20 %) al metotrexato a los seis meses de tratamiento, que aquellos pacientes seronegativos de estos anticuerpos (riesgo = 0,44). El riesgo relativo observado fue 1,85 (IC = 0,9-3,9) y se demostró asociación entre la presencia de anticuerpos anti-PFC al inicio del tratamiento y la no respuesta o la baja respuesta al tratamiento con metotrexato, a los seis meses de tratamiento ($\chi^2 = 4,2$; OR = 5,8; IC = 1,3-26,1; $p = 0,0402$).

Es importante señalar que se observó una tendencia lineal ($\chi^2 = 6,6$; $p = 0,018$), donde el riesgo fue mayor para los pacientes con concentraciones de anticuerpos anti-PFC superiores a 40 U/mL (riesgo = 0,86; riesgo relativo = 1,9; IC = 0,9-4,1) y para los pacientes con concentraciones inferiores e iguales a 40 U/mL (riesgo = 0,77, riesgo relativo=1,7; IC = 0,8-3,7), en comparación con los pacientes seronegativos de estos anticuerpos (riesgo = 0,44) al inicio del tratamiento, con diferencias entre los tres niveles de riesgo ($\chi^2 = 6,5$; $p = 0,037$).

En varias investigaciones se ha demostrado que la presencia de ACPC al inicio del tratamiento se vincula a un peor pronóstico y a una peor respuesta al tratamiento con metotrexato ^(30,31).

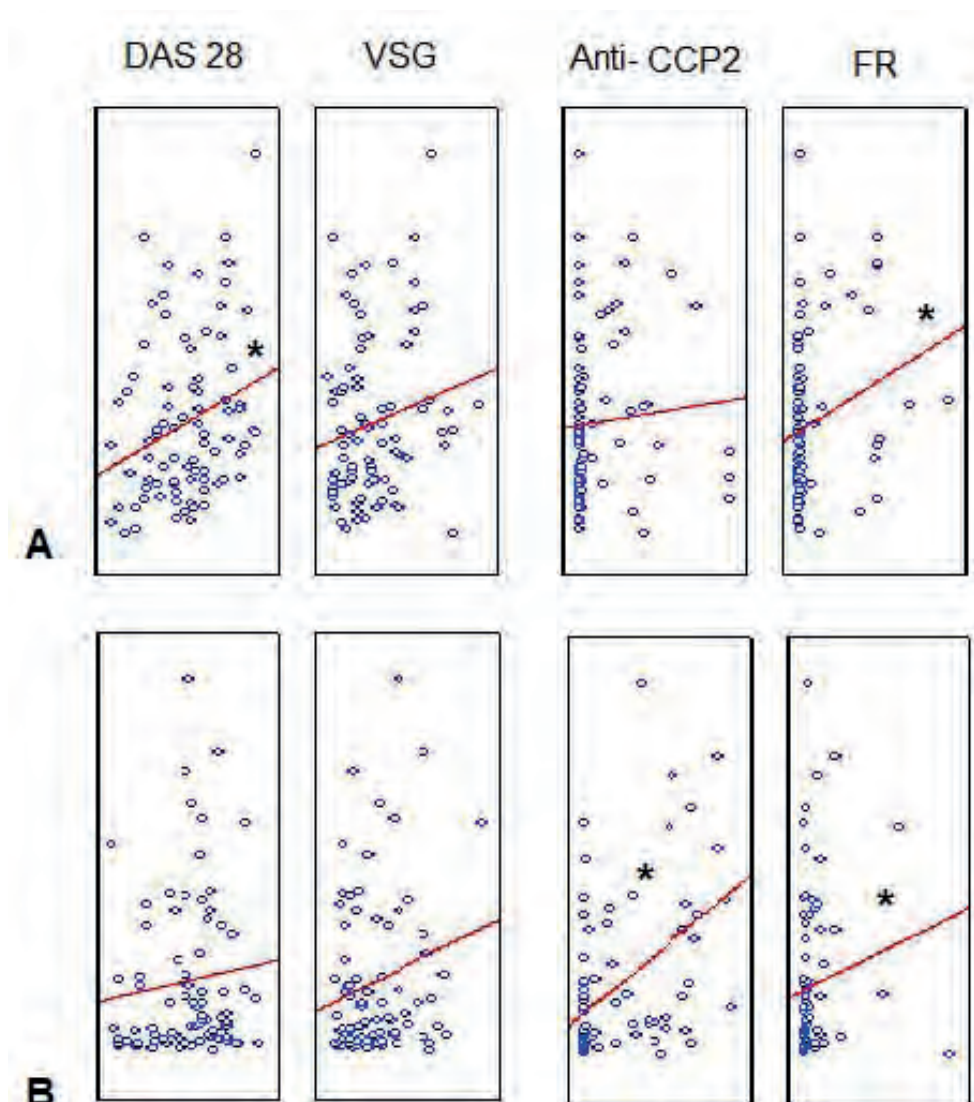


Fig. 3. Correlación de los anticuerpos anti-PFC y los indicadores clínicos y serológicos de actividad de la enfermedad. A) AR temprana. B) AR establecida. AR: artritis reumatoide. DAS 28: índice de actividad de la enfermedad basado en el conteo de 28 articulaciones. VSG: velocidad de sedimentación globular. Anti-CCP 2: anti péptidos citrulinados de segunda generación. FR: factor reumatoide comercial. *Correlación de Spearman para los anticuerpos anti-PFC con el DAS 28 ($r=0,2714$; $p=0,0142$) y el FR ($r=0,299$; $p=0,0066$) en la AR temprana y en la AR establecida con los anticuerpos anti-CCP2 ($r=0,5050$; $p=0,0000$) y FR ($r=0,4074$; $p=0,0002$) con los anticuerpos anti-PFC.

Los resultados de esta investigación demuestran la utilidad de los anticuerpos anti-PFC no solo para medir la actividad de la enfermedad y definir tratamiento, sino como variable de pronóstico para medir la evolución clínica y la respuesta al tratamiento. La presencia de anticuerpos anti-PFC, representa un mayor riesgo para un mal pronóstico clínico y baja respuesta al tratamiento. Este resultado se relaciona con la implicación de los antígenos citrulinados de proteínas como el fibrinógeno en la etiopatogenia de la AR.

Se ha observado que el fibrinógeno citrulinado es capaz de activar a los macrófagos a través de receptores específicos contribuyendo a la liberación de citocinas proinflamatorias⁽³²⁾. En este contexto este antígeno es presentado al sistema inmune, lo que conlleva a la ruptura de la tolerancia como se ha postulado en la inmunopatogenia de la AR^(1,2).

La producción de citocinas, de anticuerpos y formación de inmunocomplejos que participan en el daño articular, desencadenada tras estos eventos, justifican el hecho de que los anticuerpos anti-PFC sean un factor de mal pronóstico clínico y mala respuesta al tratamiento.

El costo por paciente de la determinación de anticuerpos anti-PFC es inferior (5,52 CUC) a los anticuerpos anti-CCP2 (14,00 CUC). Para la determinación de FR el costo por paciente es de 4,54 CUC y el costo del kit comercial pesos por paciente, mientras que el ensayo comercial de 11,80 pesos por paciente. La técnica de AKA tiene un costo de 1,79 pesos por paciente, mientras que el ensayo comercial es de 6,00 CUC por paciente.

Conclusiones

Se introdujeron en la práctica la determinación de anticuerpos FR, AKA y anticuerpos anti-PFC. La determinación de anticuerpos contra el péptido del fibrinógeno citrulinado es un biomarcador novedoso, de menor costo, buen desempeño diagnóstico y de gran utilidad para medir el pronóstico de pacientes cubanos con AR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. *Immunología Celular y Molecular* (8va ed). Barcelona: Elsevier Saunders; 2015.
2. Fox DA. Etiology of rheumatoid arthritis: A historical and evidence-based perspective. In: Chung KC, *Clinical Management of the Rheumatoid Hand, Wrist, and Elbow*. Springer International Publishing: Switzerland, 13-19, 2016.
3. Trouw L, Rispens T, Toes R. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews/rheumatology* 2017;13(6):331-339.
4. González M, Rueda J, González H, Cantora E. Artritis reumatoide temprana: resultados clínicos y funcionales de una cohorte en un centro de alta complejidad, Cali-Colombia. *Rev Colomb Reumatol* 2016;23(3):148-154.

5. Wagner C, Sokolove J, Lahey L, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Alfredsson L y cols. Identification of anticitrullinated protein antibody reactivity 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.
6. Yarwood A, Huizinga T, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology* 2016;55:199-209.
7. Arnett FC, Bloch DA. The American Rheumatism association 1987. Revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-23.
8. Romana F, Pecani A, Conti F, Mancini R, Alessandri C, Valesini G. Post-translational modifications in rheumatoid arthritis and atherosclerosis: Focus on citrullination and carbamylation. *Journal of International Medical Research* 2016;44:81-84.
9. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2569-8.
10. Bos W, Van de Stadt L, Sohrabian A, Rönnelid J, Van Schaardenburg D. Development of anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor isotypes prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2014;16:405.
11. Díaz-Toscano ML, Olivas-Flores EM, Zavaleta-uñiz SA, Gámez-Nava JI, Cardona-Muñoz EG, Ponce-Guarneros M y cols. Comparison of two assays to determine anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis in relation to other chronic inflammatory rheumatic diseases: assaying anti-modified citrullinated vimentin antibodies adds value to second-generation of anticitrullinated cyclic peptides testing. *Biomed Res Intl*. [Internet]. 2014 [consultado 1 de octubre de 2017]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/198198>.
12. Molina E, Del Rincon I, Restrepo JF, Battafarano DF, Escalante A. Mortality in Rheumatoid Arthritis (RA): factors associated with recording RA on death certificates. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2015;16:277-283.
13. Ossipova E, Cerqueira CF, Reed E, Kharlamova N, Israelsson L, Holmdahl R et al. Affinity purified anti-citrullinated protein/peptide antibodies target antigens expressed in the rheumatoid joint. *Arthritis Research & Therapy* 2014;16(4):1-11.
14. Arana V, Ku R, Canul J, Chan Zapata I, Torres J. Importancia clínica de los anticuerpos péptidos cíclicos citrulinados en el diagnóstico de la artritis reumatoide. *RelbCi* 2015;2(2):1-14.
15. Ospelt C, Bang H, Feist E, Camici G, Keller S et al. Carbamylation of vimentin is inducible by smoking and represents an independent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;0:1-8.
16. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M y cols. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* 2017;76(6):960-977.
17. Prevoo MLL, Van't Hof MA, Kuper HH, Van Leeuwen MA, Van de Putte BA, Van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twentyeight-joint counts. *Arthritis rheum* 1995;38:44-8.
18. Prada D, Hernández CI, Gómez JA. Evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con artritis reumatoide en el Centro de Reumatología. *Rev Cuba Reumatol*. [Inter-

- net]. 2015 [consultado 1 de octubre de 2017]; 17(1). [aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://www.revreumatologia.sld.cu/index.php/reumatologia/article/view/385>.
19. CECMED. Centro para el control de la calidad de los medicamentos. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnósticos. Regulación 47-2007. 2007.
 20. CECMED. Centro para el control de la calidad de los medicamentos. Requisitos para la autorización de comercialización de diagnósticos. Regulación D-08-13. 2013.
 21. Ochoa Azze RF. Bases Metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. 1 ed. Ciudad de La Habana: Finlay, 2004.
 22. Blachère NE, Parveen S, Fak J, Frank MO, Orange DE. Inflammatory but not apoptotic death of granulocytes citrullinates fibrinogen. *Arthritis Research & Therapy* 2015;17:369-376.
 23. Cornillet M, Sebbag M, Verrouil E, Magyar A, Babos F, Ruysen-Witrand A y cols. The fibrin-derived citrullinated peptide β 60-74Cit60,72,74 bears the major ACPA epitope recognised by the rheumatoid arthritis-specific anticitrullinated fibrinogen autoantibodies and anti-CCP2 antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;61(1-2):117-125.
 24. Nicaise-Roland, L. Nogueira, C. Demattei y cols. Autoantibodies to citrullinated fibrinogen compared with anti-MCV and anti-CCP2 antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis at an early stage: data from the French ESPOIR cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013;72(3):357-362.
 25. Gonzalez-Lopez L, Rocha-Muñoz AD, Ponce-Guarneros M, Flores-Chavez A, Salazar-Paramo M, Nava A y cols. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (Anti-CCP) and Anti-Mutated Citrullinated Vimentin (Anti-MCV) Relation with Extra-Articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*. [Internet]. 2014 [consultado 15 de octubre de 2017]; [aprox. 10 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804270>.
 26. Mathsson L, Fountai DL, Cadwell KK, Madrigal AM, Gallo G, Poo rafshar M. The performance of anti-cyclic citrullinated peptide assays in diagnosing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2018;36:144-152.
 27. Muñoz-Grajales C, Muñoz Vahos CH, Díaz Betancur J, Ramírez Gómez LA. Frecuencia de anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado y factor reumatoide en pacientes con enfermedades reumatológicas de un centro de reumatología, Medellín, Colombia. *Rev Colomb Reumatol* 2014; 21(4):177-182.
 28. Bax M, Huizinga TW, Toes RE. The pathogenic potential of auto-reactive antibodies in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2014; 36 (3): 313-325.
 29. Bello A, Perkins E, Jay R, Efthimiou P. Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology: Research and Reviews* 2017;9:67-79.
 30. Janssen KMJ, Westra J, Chalan P, Boots AMH, De Smit MJ, Van Winkelhoff AJ et al. Regulatory CD4+ T-cell subsets and anti-citrullinated protein antibody repertoire: potential biomarkers for arthritis development in seropositive arthralgia patients? *PLoS ONE* 2016; 11(9):1-13.
 31. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):492-509. 2014.
 32. 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 Research & Therapy* 2016;18:284-293.

Recibido: 04/05/2020

Aprobado: 23/08/2020

Agradecimientos. Agradecemos la colaboración de Jorge Alexis Rodríguez y Dinorah Prada Hernández del Centro de Reumatología; Hilda Elisa Garay Pérez del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Conflictos de intereses. Los autores no presentan conflicto de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribución de autores

1. Conceptualización: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives
2. Curación de datos: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich, Cira Rodríguez Pelier
3. Análisis formal: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Cira Rodríguez Pelier
4. Adquisición de fondos: Goitybell Martínez Téllez, Cira Rodríguez Pelier
5. Investigación: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich, Cira Rodríguez Pelier
6. Metodología: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich
7. Administración del proyecto: Goitybell Martínez Téllez
8. Recursos: Goitybell Martínez Téllez Cira Rodríguez Pelier
9. Software: Goitybell Martínez Téllez, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich
10. Supervisión: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Cira Rodríguez Pelier
11. Validación: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives
12. Visualización: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich, Cira Rodríguez Pelier
13. Redacción – Goitybell Martínez Téllez
14. Redacción – revisión y edición: Goitybell Martínez Téllez, Bárbara Torres Rives, Vicky Sánchez Rodríguez, Maité Martiatu Hendrich, Cira Rodríguez Pelier

Financiación. El financiamiento fue proveniente del MINSAP, Cuba.

