



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

UTILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS
CICLICOS CITRULINADOS Y DEL FACTOR REUMATOIDE
(ISOTIPOS IgG, IgA E IgM) EN EL DIAGNOSTICO DE
PACIENTES CON ARTRITIS TEMPRANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

ELIZABETH OLIVARES MARTINEZ



MEXICO, D. F.

2005

m345878



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Prof. María Dolores Lastra Azpilicueta
Vocal	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	Prof. Javier Cabiedes Contreras
1 er Suplente	Prof. Arturo Victor Rosales Olivares
2° Suplente	Prof. Ma. Del Socorro Reyna Rodríguez

Sitio en donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Inmunología y Reumatología.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.
Salvador Zubirán.

Asesor del tema:


Dr. Javier Cabiedes Contreras

Sustentante:


Elizabeth Olivares Martínez

Agradezco al
Dr. Octavio Velásquez de la Torre por su desinteresado apoyo económico para
la impresión de esta tesis.

Abreviaturas

Abc	Área bajo la curva
AFP	Anti-factor perinuclear
AKA	Anticuerpos antiqueratina
ANCA	Anti-citoplasma del neutrófilo
anti – PCC	Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados
anti-IgG-FA	Anti-IgG conjugada con fosfatasa alcalina
AR	Artritis reumatoide
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CAR	Colegio Americano de Reumatología
DAS28	índice de actividad, 28 articulaciones evaluadas
DSX	Equipo automatizado para realizar ensayos inmunoenzimáticos
DO	Densidad óptica
EIE	Ensayos inmunoenzimáticos
ED	Immunoscan RA [Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden]
IN	Quanta Lite CCP IgG ELISA [INOVA Diagnóstica]
EI	Euroimmun [Medizinische Labordiagnostika AG]
EVAD	Escala visual análoga para el dolor
EVAG	Escala visual análoga para el estado general de la enfermedad
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conjuntivo
FMDE	Fármacos modificadores de la enfermedad
FR	Factor reumatoide
HAQ	Cuestionario de auto-evaluación

HRP	Peroxidasa de rábano
IFP	Interfalángicas proximales
LEG	Lupus eritematoso generalizado
MCF	Metacarpofalángicas
MTF	Metatarsofalángicas
Orgentec	Rheumatoid Factor [Orgentec Diagnostika GmbH]
INOVA	Quanta Lite RF IgG, IgA e IgM [INOVA Diagnostics]
PAD	Peptidilarginina deiminasa
PNFF	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
SSP	Síndrome de Sjögren primario
TA	Temperatura ambiente
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametil-benzidina
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VR	Valores de referencia
VSG	Velocidad de sedimentación globular

INDICE

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Generalidades.....	5
3.1. Antecedentes históricos.....	5
3.2 Marcadores serológicos en la AR.....	6
3.2.1 Factor Reumatoide (FR).....	6
3.2.2 Otros anticuerpos asociados a AR.....	6
3.2.3. Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados.....	6
3.3 Desarrollo de pruebas para la detección de anticuerpos anti-PCC.....	7
3.4 Determinación de anti-PCC mediante EIE de segunda generación....	7
3.5 Citrulinación: enzima Peptidilarginina deiminasa y sus sustratos....	8
3.6 Papel de los anticuerpos anti-PCC en AR.....	9
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	11
Pacientes y métodos.....	11
6.1 Pacientes y controles.....	11
6.1.1. Definiciones.....	11
6.1.2 Evaluaciones médicas.....	11
6.2 Determinación de anti-PCC.....	12
6.2.1 Principio de la prueba.....	13
6.2.2 Método.....	13
6.2.3 Manejo y almacenamiento.....	13
6.2.4 Procedimiento del ensayo.....	13
6.2.4.1 Protocolo de lavado.....	13
6.3 Protocolo del ensayo Immunoscan RA(EURO-DIAGNOSTICA, Malmoe, Sweden).....	14
6.3.1 Control de calidad.....	14
6.3.2 Método de cálculo.....	14
6. 4 Protocolo del ensayo QUANTA Lite TM CCP IgG ELISA (INOVA Diagnostics, Inc.).....	15
6. 4.1 Control de calidad.....	15
6. 4.2 Método de cálculo.....	16
6.5 Protocolo del ensayo Anti-CCP ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG).....	16
6.5.1 Método de calculo.....	16
6.6 Cuantificación de Factor Reumatoide.....	17
6.6.1 Principio de la prueba	17

6.7 Protocolo del ensayo Rheumatoid Factor (IgG, IgA e IgM) de la marca Orgentec Diagnostika).....	17
6.7.1 Control de calidad.....	18
6.7.2 Método de cálculo.....	18
6.8 Protocolo del ensayo QUANTA Lite™ RF ELISA (INOVA, Diagnostics, Inc.).....	18
6.8.1 Control de calidad.....	19
6.8.2 Método de cálculo.....	19
6.9 Análisis estadístico.....	20
Resultados.....	21
7.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos estudiados...	21
7.1.1 Sujetos sanos.....	21
7.1.2 Pacientes con artritis temprana.....	21
7.1.3 Pacientes con AR	21
7.2 Características de los equipos para detectar anticuerpos anti-PCC...	21
7.3 Comparación de los equipos para detectar FR (isotipos IgG, IgA e IgM) y anticuerpos anti-PCC.....	22
7.4 Establecimiento de los valores de referencia para la detección del FR (isotipos IgG, IgA e IgM) y de los anticuerpos anti-PCC.....	24
7.5 Sensibilidad y Especificidad.....	27
7.6 Curvas de distribución del FR (isotipos IgG, IgA e IgM).....	29
7.6.1 FR-IgG.....	29
7.6.2 FR-IgA.....	30
7.6.3 FR-IgM.....	31
7.6.4 Curvas de distribución de anti-PCC.....	31
7.7 Pacientes con artritis temprana: actividad y su correlación con la serología.....	32
Discusión.....	35
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40
Anexo.....	43
11.1 Cuestionario de evaluación estado de salud HAQ.....	43
11.2 Escala visual análoga para el paciente.....	45

Resumen

La Artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, generalizada, de etiología multifactorial y distribución universal. Su prevalencia está en torno al 1% en la población adulta. Estudios recientes muestran que los individuos afectados tienen cierta predisposición genética. Las estrategias terapéuticas actuales para AR recomiendan tratamientos agresivos en etapas tempranas de la enfermedad por lo tanto es necesario contar con pruebas serológicas que permitan el diagnóstico en dichas etapas. En la última década los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC) han adquirido mayor relevancia debido a su sensibilidad y especificidad para Artritis temprana.

En el presente trabajo estudiamos 100 sujetos sanos (67 mujeres) con promedio de edad de 37.9 ± 12.2 años; 44 pacientes con artritis temprana (menos de un año de evolución) con promedio de edad de 39.1 ± 14.7 años (37 mujeres) y 25 pacientes con AR tardía, con promedio de edad de 47.5 ± 12.9 años (23 mujeres). Evaluamos clínica y serológicamente la actividad de la artritis. La detección de los anticuerpos anti-PCC la hicimos mediante ensayos inmunoenzimáticos (EIE) utilizando tres diferentes marcas de equipos, las placas estaban sensibilizadas con péptidos cíclicos citrulinados sintéticos de segunda generación Immunoscan RA [ED anti-PCC, Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden], Quanta Lite CCP IgG ELISA [IN anti-PCC, INOVA Diagnóstica] y Euroimmun [EI anti-PCC Medizinische Labordiagnostika AG]. El factor reumatoide (FR) de isotipos IgG, IgA e IgM se cuantificó mediante EIE utilizando dos equipos diferentes (Quanta Lite RF IgG, IgA e IgM [INOVA Diagnostics] y Rheumatoid Factor [Orgentec Diagnostika GmbH].

Mediante curvas ROC determinamos el rendimiento global de cada prueba para los diferentes equipos tanto para la detección de anticuerpos anti-PCC como para la detección de la actividad de FR. Las mejores áreas bajo la curva se obtuvieron con los equipos de Orgentec Diagnostika para el FR de los tres isotipos y Immunoscan RA [ED anti-PCC, Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden] para los anticuerpos anti-PCC. A partir de dicho análisis establecimos los valores de referencia con la más alta sensibilidad y especificidad y calculamos los coeficientes de correlación de los diferentes equipos. Una vez seleccionado el mejor equipo, analizamos en los tres grupos (controles sanos, pacientes con artritis temprana y pacientes con AR tardía)

las curvas de distribución de los títulos obtenidos para cada una de los ensayos. Los pacientes con AR tardía presentaron títulos más altos de FR isotipo IgA que los pacientes con artritis temprana (83.7 [11.7-1401.3 UI/mL] vs. 41.1 [5.5-1231.2 UI/mL], $p=0.028$). Los pacientes con artritis temprana y anticuerpos anti-PCC tuvieron mayor actividad clínica y serológica que los pacientes con artritis temprana sin anticuerpos anti-PCC. Los pacientes con artritis temprana con FR-IgG e IgA tuvieron mayor actividad serológica de la artritis que aquellos sin actividad de FR. Mediante regresión logística definimos la correlación entre la presencia de anticuerpos y el número de criterios del Colegio Americano de Reumatología (CAR) para AR en la población de pacientes con artritis temprana. Los enfermos con anticuerpos anti-PCC y FR-IgA positivos tuvieron 3.5 veces más probabilidad de tener un mayor número de criterios (5 ó 6) que los pacientes con anti-PCC y FR-IgA negativos. Los anticuerpos anti-PCC y el FR-IgA parecen ser útiles en la identificación temprana de pacientes con AR tardía. Los anticuerpos anti-PCC y los isotipos de FR permiten identificar a pacientes con mayor actividad articular.

Introducción

La AR es una enfermedad de distribución universal. Su prevalencia está en torno al 1% de la población adulta, aunque este porcentaje depende en gran medida de las series estudiadas. La enfermedad es más frecuente en mujeres que en varones (2-3 mujeres por cada varón afectado). La mayor incidencia ocurre en mujeres entre los 40 y los 60 años de edad ¹.

La AR es una enfermedad autoinmune, generalizada, de etiología multifactorial. Estudios recientes muestran que los individuos afectados tienen cierta predisposición genética ². Los antígenos HLA de clase II (DR1 y DR4) pertenecen al Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) y son los que presentan mayor asociación con la AR. La hipótesis de que un agente infeccioso pudiera ser el factor iniciador es una de las más aceptadas. Algunas infecciones como la enfermedad de Lyme, las infecciones por Parvovirus B19 y la rubéola producen cuadros de poliartritis muy similares a la AR ²⁻⁵.

Aunque puede afectar diversos órganos, la AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, de las vainas tendinosas y de las bursas sinoviales de deslizamiento. El tejido sinovial inflamado tiene características destructivas locales, invade y daña a las estructuras de la articulación, resultando en la pérdida de la función. La inflamación lleva a la destrucción de la articulación la cual es responsable de la discapacidad que produce la enfermedad ⁵.

El diagnóstico de la AR se fundamenta primordialmente en las manifestaciones clínicas. El apoyo serológico se caracteriza por la presencia de FR (isotipos IgG, IgA e IgM) el cual es poco específico porque se encuentra en infecciones crónicas y en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG), la enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) y el síndrome de Sjögren primario (SSP), inclusive a títulos mayores que en AR. También se ha detectado FR en población adulta y en sujetos sanos ⁶⁻⁸.

Para propósitos de clasificación se dice que un paciente tiene artritis reumatoide si cumple al menos cuatro de los siete criterios propuestos por el CAR en 1987⁹. Los criterios 1 al 4 deben de estar presentes al menos durante seis semanas. La sensibilidad de estos criterios es del 91.2% y su especificidad del 89.3%, tabla 1. Sin embargo estos criterios se establecieron con base en las características clínicas de

pacientes con AR tardía, alrededor de 10 años. Se ha cuestionado su utilidad en las fases tempranas de la enfermedad (sensibilidad 80.9%, especificidad de 88.2 %).

Tabla 1. Criterios revisados en 1987 para la clasificación de los pacientes con artritis reumatoide³

Criterio	Definición
1. Rigidez matutina	Rigidez matutina en las articulaciones y alrededor de ellas, por lo menos de una hora de duración antes de la mejoría máxima.
2. Artritis de dos o más articulaciones	Al menos tres áreas articulares de deben tener simultáneamente hinchazón de tejidos blandos o derrame (no sólo crecimiento óseo), observada por un médico. Las 14 áreas articulares posibles son: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas (MTF) derechas e izquierdas, respectivamente.
3. Artritis de las articulaciones de las manos	Al menos un área articular inflamada (según se describe previamente) de las siguientes: carpo, MCF e IFP.
4. Artritis simétrica	Afección simultánea de las mismas áreas articulares en ambos lados del cuerpo.
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre las prominencias óseas, superficies extensoras o regiones yuxtaarticulares, observados por un médico.
6. Factor Reumatoide en suero	Demostración de cantidades anormales de "factor reumatoide" por el método que sea positivo en menos del 5% de la población de controles normales.
7. Cambios radiológicos	Cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en la radiografía PA de manos y muñecas, los cuales deben incluir erosiones o descalcificación inequívoca localizada o más acentuada en zonas adyacentes a las articulaciones afectadas.

En la última década, se ha propuesto que el tratamiento de la AR debe de ser agresivo y temprano, con los llamados fármacos modificadores de la enfermedad (FMDE), si se quiere evitar el daño radiográfico y el deterioro funcional. Para ello, es necesario diagnosticar tempranamente esta entidad la cual, en etapas iniciales tiene ciertas peculiaridades clínicas y serológicas. No existe consenso actual sobre como definir artritis temprana si bien la mayoría de los investigadores se refieren al término de "temprana" cuando los síntomas tienen menos de un año de duración.

Generalidades

3.1. Antecedentes históricos

La primera descripción científica de la AR data de 1800, cuando el médico francés Landré-Beauvais describió en su tesis a nueve mujeres con una forma de reumatismo que consideró como una variante de la gota y que denominó "*goutte asthenique primitive*". No obstante, existen evidencias de este padecimiento en diversas pinturas realizadas por Rubens a finales del siglo XVI y a mediados del XVII. En 1818, Brodie reconoció que el daño se iniciaba en la membrana sinovial. Los descubrimientos posteriores de Charcot contribuyeron en gran medida a diferenciar la gota, la enfermedad articular degenerativa y la AR. Fue en 1892 cuando Garrod propuso el nombre de AR, el cual sigue vigente en nuestros días. En 1873, Adams describió los nódulos subcutáneos previamente asociados a la AR, cuyas características histológicas serían delineadas por Collins en 1937. En 1912, Billings propuso la hipótesis de una etiología infecciosa como causante de una entidad. En 1924, Felty describió cinco casos de una variante de la AR acompañada de esplenomegalia y leucopenia, trastorno que a la postre sería denominado con el epónimo de síndrome de Felty propuesto por Hanrahan y Mullar, en 1932. El término de AR se aceptó oficialmente en la nomenclatura inglesa en 1922 y en la norteamericana en 1941. En 1953, Caplan describió cambios pulmonares característicos en mineros con AR, síndrome que más adelante se denominaría síndrome de Caplan.¹⁰

Una de las observaciones más relevantes del presente siglo fue la descripción de Waaler. En 1937, mostró que los eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos eran aglutinados por el suero de los pacientes con AR. En 1948 Rose comprobó este hallazgo y en 1949 Coggeshall propuso el término de "factor reumatoide" para definir el fenómeno arriba descrito. Posteriormente el factor reumatoide fue identificado como un autoanticuerpo. A mediados de los años 50's fue caracterizado por Kunkel, Franklin y Muller-Eberhard, entre otros, como una molécula de inmunoglobulina de isotipo IgM dirigida contra la fracción cristalizante (Fc) de la molécula de IgG. En la actualidad a esta molécula se le reconoce como FR clásico¹¹⁻¹².

3.2 Marcadores serológicos en la AR

3.2.1 Factor Reumatoide

El FR es un grupo de inmunoglobulinas de isotipos IgG, IgA o IgM dirigidas contra el Fc de los anticuerpos de isotipo IgG. Los métodos usados para su detección son la nefelometría y EIE.

La determinación del FR es de gran utilidad en el diagnóstico de la AR, además tiene un valor pronóstico. Los títulos altos de FR se han asociado con mayor daño articular, la progresión radiológica, la incapacidad funcional y con la presencia de manifestaciones extra articulares. Es decir, con una expresión más agresiva de la enfermedad.¹³

3.2.2 Otros anticuerpos asociados a AR

Además del FR otros autoanticuerpos se han asociado con la AR aunque no presentan una especificidad tan alta. Entre ellos, destacan: RA33, anti-calpastatina, anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA), anti-colágena tipo II y anti-fosfolípidos. Algunos han sido propuestos como útiles en el seguimiento sin embargo en la actualidad rara vez se usan¹⁴.

3.2.3. Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados

En años recientes los anti-PCC han adquirido mayor relevancia debido a su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de AR¹⁵.

La historia de los anti-PCC empieza en 1964 cuando Nienhuis y Mandema describieron por primera vez los anticuerpos anti-factor perinuclear (AFP)¹⁶. En 1979 Young y cols. identificaron los anticuerpos antiqueratina (AKA)¹⁷. Ambos autoanticuerpos, detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, mostraron alta especificidad para la AR (entre 90 y 98%). Sin embargo debido a la sensibilidad limitada (40-55 %), a las dificultades técnicas para su determinación y a

la falta de estandarización de las técnicas utilizadas, estos autoanticuerpos se vieron relegados a trabajos de investigación y a laboratorios de inmunología especializados. En 1995 Sebbag y cols. mostraron que tanto los AKA como los APF reconocían moléculas relacionadas con la filagrina y la profilagrina.¹⁸ No obstante, los resultados entre los distintos grupos de investigación eran discordantes y dependían del sustrato y de los métodos utilizados para la purificación de la filagrina.

3.3 Desarrollo de pruebas para la detección de anticuerpos anti-PCC

En 1998, Schellekens y cols. mostraron que sólo en presencia de residuos de citrulina los anticuerpos de los pacientes con AR reconocían la molécula de filagrina¹⁹. Se desarrollaron EIE con mezclas de péptidos citrulinados lineales, con lo que se aumentó la sensibilidad al 76% con una especificidad del 96%. Si bien los EIE eran una metodología relativamente sencilla y reproducible, el hecho de utilizar varios péptidos para llegar a la citada especificidad dificultaba su aplicación clínica. Este problema se solucionó mediante el ciclado de los péptidos, lo cual aumentó considerablemente la sensibilidad diagnóstica de la técnica. En la actualidad se disponen de EIE de segunda generación con PCC, los cuales son utilizados en la detección de anti-PCC²⁰.

3.4 Determinación de anti-PCC mediante EIE de segunda generación

El procedimiento para la detección de los anti-PCC se basa en la técnica de EIE la cual cuantifica los autoanticuerpos de isotipo IgG presentes en el suero de los pacientes. El antígeno usado es un péptido cíclico sintético que contiene citrulina. Las placas de EIE se sensibilizan con el antígeno formado por péptidos cíclicos citrulinados. Se adicionan los calibradores, controles y las diluciones de las muestras. Los anticuerpos específicos se unen durante la incubación. El resto de los componentes no unidos se elimina mediante lavados. Posteriormente se añade el conjugado anti-IgG-enzima. En una segunda incubación, el conjugado se une a los anticuerpos de isotipo IgG específicos y después de un lavado para eliminar el conjugado sobrante, se añade un sustrato cromogénico. El color desarrollado será proporcional a la cantidad de anticuerpo conjugado y éste a su vez será proporcional a la cantidad de anticuerpo de isotipo IgG específico anti-PCC.

3.5 Citrulinación: enzimas peptidilarginina deiminasa (PAD) y sus sustratos

La citrulina es el resultado de la modificación enzimática postraducciona de los residuos de arginina. La citrulina se presenta en pocas proteínas humanas, una de ellas es la filagrina. La profilagrina se encuentra en los gránulos de las células de la mucosa bucal humana. Es escindida proteolíticamente en varias subunidades de filagrina durante la diferenciación celular. En dicho proceso la proteína es defosforilada y algunos residuos de arginina son convertidos en citrulina por la enzima PAD de la cual existen cinco diferentes isotipos y se identifican por el tejido en el cual se expresan. Tabla 2.

Tabla 2. Expresión de peptidilarginina deaminasa (PAD)

Isotipo	Sitio de expresión de las proteínas
PAD 1	Epidermis, útero.
PAD 2	Músculo esquelético, cerebro, células de la glia, oligodendrocitos, útero, páncreas, glándulas salivales, glándula pituitaria, bazo, macrófagos, médula ósea.
PAD 3	Folículos pilosos.
PAD 4	Granulocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos.
PAD 6	Células pluripotenciales embrionarias, oocitos.

El paso de arginina a citrulina conlleva una ligera variación en cuanto al peso molecular del aminoácido pero con cambio de las cargas existentes, ya que pasa de ser un aminoácido positivo a ser un aminoácido neutro. Este cambio de cargas da origen a variaciones en la estructura terciaria de la proteína, haciendo que se modifiquen sus propiedades antigénicas. Los isotipos 2 y 4 son los únicos candidatos involucrados en la citrulinación de proteínas en la AR. Estos son expresados en monocitos y macrófagos, los cuales están presentes en cantidades abundantes en la sinovia inflamada y en granulocitos del líquido sinovial¹⁶.

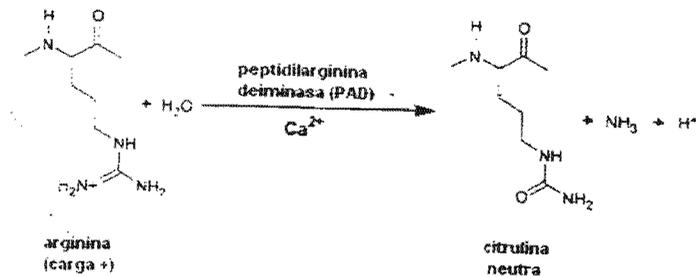


Fig. 1 Conversión enzimática de arginina a citrulina por PAD.

Algunas citocinas como el factor de necrosis tumoral e interleucinas juegan un papel importante en la iniciación y perpetuación de la inflamación crónica característica de la AR. En teoría, estas citocinas pueden estar involucradas en la modulación de la actividad de las PAD y por lo tanto en la consecuente producción de autoanticuerpos¹⁶. Sin embargo, la AR no afecta a los tejidos que contienen normalmente filagrina, como la piel o la mucosa oral y la filagrina no se encuentra en la membrana sinovial. La membrana sinovial de pacientes con AR está infiltrada por células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-filagrina, lo cual sugiere la presencia de un autoantígeno reconocido por estos anticuerpos. En este sentido, Baeten demostró que la membrana sinovial de pacientes con AR presentaba proteínas intracelulares citrulinadas, que no eran reconocidas por anticuerpos monoclonales contra la filagrina²¹. Recientemente se mostró que la citrulinación de proteínas sinoviales en modelos murinos de AR era un proceso activo dependiente de la presencia de PAD 4 humana, lo cual sugería que la inducción de autoanticuerpos contra estos neoantígenos (proteínas citrulinadas) era/es específica de los humanos²².

3.6 Papel de los anticuerpos anti-PCC en AR

Se ha propuesto que la producción de anticuerpos anti-PCC está mediada por infecciones virales tales como la hepatitis C. Muchas enfermedades infecciosas también incrementan los títulos de FR-IgM⁵.

El papel de los anticuerpos anti-PCC en la patogénesis de la AR no es claro. Una teoría propone que el incremento en la transformación de la arginina a citrulina

durante la apoptosis puede inducir, en individuos con predisposición genética, la síntesis de anticuerpos anti-PCC inclusive en los meses previos a la aparición de los síntomas clínicos de la AR ²³.

Un posible mecanismo fisiopatológico es el que presentan Vossenaar cols, quienes sugieren que una infección puede desencadenar una respuesta inflamatoria en la cual se puede producir daño y muerte de las células del sistema granulocítico. Las enzimas intracelulares como la PAD pasarían al medio extracelular, produciendo la citrulinación de ciertas proteínas. Estas proteínas citrulinadas se comportarían como neoantígenos y serían presentadas a los linfocitos T, por las células presentadoras de antígeno unidas a moléculas del CPH. Se produciría una estimulación de los linfocitos T, que a su vez estimularían a los linfocitos B para producir anti-PCC. Dichos anticuerpos se unirían a las proteínas citrulinadas produciendo la activación del sistema fagocítico-mononuclear la cual, estimularía el reclutamiento de granulocitos. Pequeñas alteraciones en este proceso pueden llevar a la perpetuación de una respuesta inflamatoria anómala produciendo en definitiva AR ²⁴.

Objetivos

1. Comparar la utilidad de tres equipos para la detección de anticuerpos anti-PCC mediante EIE de segunda generación.
2. Comparar la utilidad de dos equipos para la detección de la actividad de FR Isotipos IgG, IgA e IgM mediante EIE.
3. Establecer los valores de referencia de los anticuerpos anti-PCC y del FR isotipos IgG, IgA e IgM en la población Mexicana.
4. Determinar la frecuencia de los anticuerpos anti-PCC en pacientes con artritis temprana y pacientes con AR tardía.
5. Determinar la frecuencia de FR de isotipos IgG, IgA e IgM en pacientes con artritis temprana y pacientes con AR de larga evolución.
6. Correlacionar la presencia de anticuerpos anti-PCC y FR con la actividad de la enfermedad en la población de pacientes con artritis temprana.
7. Correlacionar la presencia de anticuerpos anti-PCC y FR con el número de criterios del Colegio Americano de Reumatología para AR (CAR 1987).

Hipótesis

El incremento en la transformación de la arginina a citrulina induce en individuos con predisposición genética, la síntesis de anticuerpos anti-PCC^{23, 25}. Estudios preliminares han mostrado que los anticuerpos anti-PCC son útiles en el diagnóstico temprano de la AR y además tienen un valor pronóstico³¹.

Pacientes y métodos

6.1 Pacientes y controles

Estudiamos 100 sujetos sanos, 44 pacientes con artritis temprana y 25 pacientes con AR tardía, de todos ellos obtuvimos consentimiento informado antes de incluirlos en el estudio.

6.1.1. Definiciones

- Artritis temprana: pacientes con monoartritis, oligoartritis o poliartritis evidenciadas por un reumatólogo, de menos de un año de evolución, pertenecientes a la clínica de artritis temprana del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).
- Artritis Reumatoide: pacientes con AR (cuatro o más criterios del CAR, 1987) con 3 o más años de evolución.
- Sujetos Sanos: sujetos clínicamente sanos, de ambos sexos, en cuyos sueros los exámenes de laboratorio para sífilis, hepatitis B y VIH fueron negativos. Las muestras se obtuvieron del banco de donadores del INCMNSZ.

6.1.2 Evaluaciones médicas

Pacientes con artritis temprana. Al momento de la toma de la muestra se realizó una evaluación médica por un reumatólogo la cual incluyó:

- Recuento de articulaciones inflamadas (28 articulaciones evaluadas: hombros, codos, carpos, 1ª a 5ª MCF, 1ª a 5ª IFP y rodillas).

- Recuento de articulaciones dolorosas (28 articulaciones evaluadas: hombros, codos, carpos, 1ª a 5ª MCF, 1ª a 5ª IFP y rodillas).
- Aplicación de cuestionario de auto-evaluación HAQ (Health Assessment Questionnaire), ver Anexo 1.
- Aplicación de escala visual análoga para el dolor (EVAD). Incluye una escala de 0 a 100 mm, donde 0 implica ausencia de dolor y 100 el máximo dolor posible. Es puntuada por el paciente, ver Anexo 2.
- Aplicación de escala visual análoga para el estado general de la enfermedad (EVAG). Incluye una escala de 0 a 100 mm donde 0 implica muy buen estado general y 100 muy malo, ver Anexo 2.
- Determinación de proteína C reactiva (Nefelometría).
- Determinación de velocidad de sedimentación globular (Westergren).
- Cálculo del índice de actividad DAS28 (Disease activity Score, 28 articulaciones evaluadas) ²⁶.

Pacientes con Artritis Reumatoide de larga evolución.

Al momento de la toma de la muestra se determinó:

- Número de articulaciones inflamadas.
- Número de articulaciones dolorosas.
- Velocidad de sedimentación globular (VSG).

6.2 Determinación de anticuerpos anti-PCC

La detección de los anticuerpos anti-PCC se realizó mediante el método de EIE, utilizando tres diferentes marcas de equipos. Con el equipo Immunoscan RA (ED anti-PCC, Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden) se realizaron diluciones de las muestras 1:50 y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Al equipo Quanta Lite CCP IgG ELISA (IN anti-PCC, INOVA Diagnostics) las muestras se diluyeron 1:100 y se incubaron 30 minutos entre 18 a 22 °C. Con el equipo de Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (EI anti-PCC ELISA) las muestras se diluyeron 1:100 y se incubaron 60 minutos a 22°C

6.2.1 Principio de la prueba

Brevemente y como ya se mencionó en el apartado 3.4, los anticuerpos anti-PCC AR específicos son capturados por péptidos citrulinados sintéticos inmovilizados en fase sólida (microplaca de ELISA). El suero diluido de los pacientes se añadió a los pozos de la microplaca y se incubó. Los anticuerpos específicos se unirán a los PCC. El resto de los anticuerpos se eliminó mediante lavados. La unión de los anticuerpos anti-PCC se pone de manifiesto mediante un anticuerpo anti-IgG conjugado a enzima el cual se incubó con su sustrato. El color desarrollado fue indicativo de la presencia de anti-PCC y es medió en un lector de microELISA.

6.2.2 Método

Se tomó una muestra de 8 mL de sangre periférica a los pacientes. Las muestras se colocaron en tubos de 12 X 75 mm con la clave del ensayo anti-PCC. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se separó el suero, mismo que permaneció almacenado a menos 20°C hasta su posterior uso en la cuantificación de autoanticuerpos.

6.2.3 Manejo y almacenamiento

Una vez iniciados los ensayos las muestras se conservaron entre 2-8°C, al resguardo de la luz. Las microplacas de EILISA se sacaron de su envoltura y se dejaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Se evitó al máximo la acción directa de la luz sobre la solución del cromógeno.

6.2.4 Procedimiento del ensayo

6.2.4.1 Protocolo de lavado

Se efectuó después de cada incubación de manera automatizada con el equipo DSX de la compañía, Dynex Technologies. En cada ensayo antes de iniciar se comprobó el funcionamiento adecuado del dispositivo de lavado, aspersion correcta de las

puntas del peine y aplicación correcta de los volúmenes de lavado. El equipo se programó para realizar tres lavados entre cada incubación.

6.3 Protocolo del ensayo Immunoscan RA (EURO-DIAGNOSTICA, Malmö, Sweden)

Las muestras se diluyeron 1:50 en el amortiguador correspondiente. Cuando todos los reactivos estuvieron a TA, se añadieron 100 µl de amortiguador de dilución (blanco), calibradores, controles negativo, positivo y 100 µl de las diluciones de las muestras en el resto de los pozos de la placa. Se incubó durante 60 min a 37°C en cámara húmeda. Se eliminó el contenido de los pozos como se mencionó en el protocolo de lavado. Posteriormente se adicionaron 100 µl/pozo del conjugado anti-IgG-HRP (peroxidasa de rábano) y se incubó durante 60 min a 37°C en cámara húmeda. Se realizó otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 µl/pozo de la solución de sustrato 3,3', 5,5'-Tetrametil-benzidina (TMB). Se incubó durante 30 min a TA. Transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción con 100 µl/pozo de solución de paro (ácido sulfúrico diluido). Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm. El cálculo de los títulos de los anticuerpos anti-PCC en las muestras se realizó de manera automática en el equipo DSX.

6.3.1 Control de calidad

El calibrador A (estándar de 1600 U/mL) siempre mostró un valor > 0.9 DO. El valor del control positivo siempre estuvo dentro del rango marcado para el control de calidad de cada equipo y el control negativo siempre fue < 25 U/mL. Si esto no se cumplía, la prueba se consideró inválida y se repitió.

6.3.2 Método de cálculo

El valor en densidad óptica (DO) del blanco se sustrajo al de las DO de los controles, estándares y muestras (la curva estándar es lineal en un rango de 25 a 1600 U/mL). Su representación gráfica se hizo a escala lineal/logarítmica, situando en el eje de las abscisas los valores de absorbancia (en DO a 450 nm) y en el eje de las ordenadas la actividad de los anticuerpos en U/mL. El título de los anticuerpos se calculó por

medio de la curva creada con los estándares. Se usó el programa *revelation 5.15* del DSX que ajustó la curva a 5 parámetros y facilitó el cálculo. La curva no funciona para valores menores a 25 U/mL. Las muestras con títulos mayores de 1600 U/mL se diluyeron y se repitieron

6.4 Protocolo del ensayo QUANTA Lite™ CCP IgG ELISA (INOVA Diagnostics, Inc.)

Las muestras se diluyeron 1:100 en su amortiguador correspondiente y cuando todos los reactivos alcanzaron la TA, se pusieron 100 µl de del PCC IgG positivo débil, PCC IgG positivo fuerte, PCC IgG calibradores B a E y de las diluciones de las muestras en los pozos correspondientes de la placa. Se incubó durante 30 min a TA. Transcurrido el tiempo se eliminó el contenido de los pozos como se mencionó en el protocolo de lavado. Posteriormente se adicionaron 100 µl/pozo del conjugado anti-IgG-HRP y se incubó durante 30 min a TA. Se hizo otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 µl/pozo de solución de sustrato TMB. Se incubó durante 30 min a TA. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 µl/pozo de solución de paro (ácido sulfúrico diluido). Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm. El cálculo de los títulos de los anticuerpos anti-PCC en las muestras se realizó de manera automática en el DSX.

6.4.1 Control de calidad

Se cumplieron todos los criterios citados a continuación:

- a. La DO del control Positivo fueron superiores a la del control positivo débil y las de éste fueron superiores a las del control negativo.
- b. El control Positivo Fuerte tuvo DOs mayores a 1.0, en tanto que las del control negativo no fueron mayores de 0.2.
- c. Las DO del control Positivo débil fueron superiores al doble del control negativo o mayor de 0.25.

6.4.2 Método de cálculo

Se utilizó el polinomio de interpolación cúbica, linear/linear (un polinomio de tercer orden) para trazar la curva.

Los títulos de los anticuerpos anti-PCC expresados en DO en el eje las abscisas, se interpolaron en la curva de los estándares para obtener su valor en U/mL en el eje de las ordenadas.

6.5 Protocolo del ensayo Anti-CCP ELISA (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG)

Las muestras fueron diluidas 1:100 en su amortiguador correspondiente y cuando todos los reactivos alcanzaron la TA, se aplicaron 100 μ l/pozo de los controles PCC negativo, PCC positivo y de las diluciones de las muestras, en sus pozos correspondientes. Se incubó durante 60 min a TA. Posteriormente se eliminó el contenido de los pozos como se mencionó en el protocolo de lavado. Se adicionaron 100 μ l/pozo de anti-IgG conjugada con fosfatasa alcalina (anti-IgG-FA) y se incubó durante 30 minutos a TA. Se hizo un segundo ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 μ l/pozo de solución de sustrato *p*-nitrofenilfosfato. Se incubó durante 30 min a TA. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l/pozo de solución de paro (NaOH, 1M). Finalmente se leyó la absorbancia a 405 nm. El cálculo de los títulos de los anticuerpos anti-PCC en las muestras se realizó de manera automática en el DSX

6.5.1 Método de cálculo

La representación gráfica de la curva estándar se hizo en una escala linear/logarítmica con la cual se determinaron los títulos de los anticuerpos anti-PCC en las muestras de los sujetos estudiados. Con las DO expresadas en el eje de las abscisas se interpolaron los valores de las muestras de los pacientes y se obtuvieron los títulos en U/mL.

6.6 Cuantificación del Factor Reumatoide

El FR de isotipos IgG, IgA e IgM se cuantificó mediante EIE utilizando dos equipos diferentes: Quanta Lite RF IgG, IgA e IgM de la marca INOVA Diagnostics Inc y los equipos Rheumatoid Factor IgG, IgA e IgM de la marca Orgentec Diagnostika GmbH.

6.6.1 Principio de la prueba

Los pozos de placas de microELISA sensibilizados con fragmentos de IgGs humanas sirven como sustrato para la detección de anticuerpos con actividad de FR. Las diluciones de los sueros de los pacientes y de los controles se incubaron en los pozos de las placas y los anticuerpos específicos se unen a los fragmentos de Fc. El resto de los anticuerpos no unidos fueron eliminados mediante lavados. La unión de los anticuerpos específicos se puso de manifiesto mediante un anticuerpo conjugado con HRP el cual se incubó con su sustrato. El color desarrollado fue proporcional a la concentración de los autoanticuerpos con actividad de FR. La actividad de FR fue medida en un espectrofotómetro a 450 nm

6.7 Protocolo del ensayo Rheumatoid Factor (IgG, IgA e IgM) de la marca Orgentec Diagnostika, GMBH

Las muestras se diluyeron 1:100 en su amortiguador correspondiente y todos los componentes de los equipos comerciales se sacaron de refrigeración para que alcanzaran la TA. El paso siguiente fue colocar 100 µl de los calibradores, controles negativo y positivo y de las diluciones de las muestras en sus pozos correspondientes en las placas. Se incubó durante 30 min. a TA. Transcurrido el tiempo, se eliminó el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados con 300 µl de solución de lavado cada uno. Posteriormente se adicionaron 100 µl/pozo del conjugado (anti-IgG, IgA o IgM humana) marcado con HRP y se incubó durante 15 min. a TA. Se hizo otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron

100 μ l/pozo de solución de TMB. Se incubó durante 15 min. a TA. y posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l/pozo de solución de paro (ácido clorhídrico). Se incubó durante 5 minutos a TA. y finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm.

6.7.1 Control de calidad

El sistema cuantitativo de la prueba para detectar la actividad de FR (isotipos IgG, IgM e IgA) está calibrado en unidades arbitrarias.

Para considerar válidos los resultados se cumplieron los criterios citados a continuación:

- i. Las U/mL del control positivo estuvieron dentro del rango de 75 a 125 U/mL.
- ii. Las U/mL del control negativo fueron menores de 10 U/mL.

6.7.2 Método de cálculo

Para hacer el cálculo de la actividad de FR en las muestras de los pacientes se trazó la curva de los estándares, cuya representación gráfica se hizo en escala lineal/logarítmica, situando en el eje de las abscisas los valores de absorbancia a 450 nm y en el eje de las ordenadas la actividad de FR en U/mL. El título de los anticuerpos con actividad de FR (isotipos IgG, IgA o IgM) se calculó interpolando los valores de DO de las muestras, en la curva creada con los estándares.

6.8 Protocolo del ensayo QUANTA Lite™ RF ELISA (INOVA, Diagnostics, Inc.)

Las muestras se diluyeron 1:100 en su amortiguador correspondiente y todos los componentes de los equipos comerciales se sacaron de refrigeración para que alcanzaran la TA. El paso siguiente fue colocar 100 μ l de los calibradores, controles negativo y positivo y de las diluciones de las muestras en sus pozos correspondientes en las placas de microELISA. Se incubó durante 30 min a TA. Posteriormente se eliminó el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados con

300 μ l cada uno de solución de lavado. Se adicionaron 100 μ l/pozo del conjugado anti-IgG, IgA o IgM humana marcado con HRP y se incubó durante 15 min a TA. Se hizo otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 μ l/pozo de solución de TMB. Se incubó durante 30 min a TA y posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l/pozo de solución de paro (ácido sulfúrico diluido). Se incubó durante 5 minutos a TA y finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm.

6.8.1 Control de calidad

Para considerar válidos los resultados se cumplieron todos los criterios siguientes.

- a. El control Calibrador A FR (IgG, IgA e IgM) tuvo una absorbancia mayor a 1.0 DO.
- b. El control negativo no fue mayor de 0.2 DO.
- c. La absorbancia del Calibrador A FR (IgG, IgA e IgM) fue superior a la del control FR (IgG, IgA e IgM) y la de este fue superior a la del control negativo.
- d. La absorbancia del control FR IgG fue superior al doble del control negativo o estuvo por arriba de 0.25 DO.

6.8.2 Método de cálculo

Para hacer el cálculo de la actividad de FR en las muestras de los pacientes se trazó la curva de los estándares, cuya representación gráfica se hizo en escala logarítmica, situando en el eje de las abscisas los valores de absorbancia a 450 nm y en el eje de las ordenadas la actividad de FR en U/mL. El título de los anticuerpos con actividad de FR (isotipos IgG, IgA o IgM) se calculó interpolando los valores de absorbancia de las muestras en la curva creada con los estándares.

6.9 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se usó el programa de computadora SPSS versión 12.0. Los puntos de corte de los anticuerpos anti-PCC y del FR (isotipos IgG, IgA e IgM) fueron determinados usando curvas ROC. Para las comparaciones de las variables se emplearon las pruebas de U de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher, valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los coeficientes de correlación entre los equipos comerciales usados para la detección de los autoanticuerpos se estimaron con la prueba de Pearson de 2 colas, valores de $p < 0.01$ fueron considerados significativos. Se utilizaron modelos de regresión logística para estimar la correlación entre la presencia de los anticuerpos estudiados y el número de criterios para AR del Colegio Americano de Reumatología.

Resultados

7.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos estudiados

7.1.1 Sujetos sanos

Se estudiaron 100 sujetos sanos con una media de edad de 37.9 ± 12.2 años de los cuales 67% fueron mujeres.

7.1.2 Pacientes con artritis temprana

Se estudiaron a 44 pacientes con una media de edad 38.7 ± 13.8 años, de los cuales 81.5% fueron mujeres. La media del tiempo de evolución fue 5.6 ± 2.7 meses. Los pacientes tuvieron en promedio 5.1 ± 1.1 criterios para AR del CAR. La media de articulaciones inflamadas fue 13 ± 5.9 , la de articulaciones dolorosas fue de 14.3 ± 7.1 , la del DAS28 fue de 6.1 ± 1.3 , la del HAQ fue de 1.4 ± 0.9 , la de la EVAG fue de 56.4 ± 27.3 y la de la EVAD fue de 55.3 ± 25.1 . Desde el punto de vista serológico, la media de la VSG fue 31.7 ± 22.5 mm/hr y la media de la proteína C reactiva de 2.3 ± 4.0 mg/dL.

7.1.3 Pacientes con AR

Los pacientes con AR tardía tuvieron una media de edad de 47.5 ± 12.9 y un tiempo medio de evolución de 15 ± 11 años. Veintitrés fueron mujeres (92%). La media de las articulaciones inflamadas y dolorosas fue de 11.5 ± 9.6 . La media de la VSG fue de 34.4 ± 30.5 mm/hr.

7.2 Características técnicas de los equipos para detectar anticuerpos anti-PCC

Las características de los equipos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Características de los equipos para detectar anti-PCC

Características	Equipos comerciales		
	ED anti-PCC ^g	IN anti-PCC ^h	EI anti-PCC ⁱ
Generación	Segunda	Segunda	Segunda
Dilución de las muestras	1:50	1:100	1:100
Muestras Tiempo de incubación/Temperatura	60 min/37° C	30 min/TA	60 min/TA
Solución de lavado	Sin colorante	Con colorante	Sin colorante
Conjugado	Anti-IgG humana/ peroxidasa	Anti-IgG humana/ peroxidasa	Anti-IgG humana/ fosfatasa alcalina
Conjugado Tiempo de incubación/Temperatura	60 min/37° C	30 min/TA	30 min/TA
Sustrato	TMB	TMB	PNFF
Solución de paro	Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico	NaOH 1.0 M
Lectura	450 nm.	450 nm.	405 nm.

Abreviaturas: TMB= 3,3',5,5'-Tetrametil-benzidina; PNFF = p-nitrofenilfosfato; TA = Temperatura ambiente; NaOH = Hidróxido de sodio.

^g Immunoscan RA de la marca Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden

^h Quanta Lite CCP IgG ELISA de la marca INOVA Diagnostics, Inc

ⁱ Anti-CCP ELISA Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG

7.3 Comparación de los equipos para detectar FR (isotipos IgG, IgA e IgM) y anticuerpos anti-PCC

La tabla 4 muestra el análisis de correlación de los títulos de FR detectados mediante dos equipos comerciales en los tres grupos de estudio. Como se puede ver, a menores valores, menor es la correlación entre los equipos. En el grupo de pacientes con artritis temprana y con AR tardía se obtuvieron los mejores coeficientes de correlación.

En los sujetos sanos las mayores discrepancias se observaron al detectar el FR de isotipo IgM (0.168). La correlación entre los equipos para el FR isotipo IgG fue de 0.381 y para el FR isotipo IgA fue de 0.438.

En el grupo de pacientes con artritis temprana los mejores coeficientes de correlación se obtuvieron para el FR-IgM (0.784) y para el FR-IgA (0.769). En pacientes con AR tardía el mejor coeficiente de correlación fue para FR-IgA (0.861).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de los títulos de FR detectados mediante dos equipos comerciales

Grupo	Coeficiente de correlación		
	IgG 1 vs 2	IgA 1 vs 2	IgM 1 vs 2
Sujetos sanos	0.381	0.438	0.168
Pacientes con artritis temprana	0.453	0.779	0.784
Pacientes con AR tardía	0.573	0.861	0.618

1 = Equipo de la marca Orgentec

2 = Equipo de la marca INOVA

La tabla 5 muestra los coeficientes de correlación entre los tres equipos para la detección de anti-PCC. En los sujetos sanos el coeficiente de correlación más bajo fue el obtenido entre los equipos **IN** y **EI** (0.397) y el más alto entre los equipos **ED** y **EI** (0.738). En el grupo de pacientes con artritis temprana, el coeficiente de correlación más bajo lo presentó la comparación entre los equipos **ED** y **EI** (0.414) y el más alto entre los equipos **ED** e **IN** (0.761). En el grupo de pacientes con AR tardía se obtuvieron los coeficientes de correlación más altos, debido a que dichos pacientes fueron los que presentaron los títulos más altos de anti-PCC (la concordancia de los anti-PCC fue mayor a título altos que a títulos medios y bajos). La mayor concordancia fue con la comparación de los equipos **IN** y **EI** (0.862). Los resultados muestran una alta variabilidad entre los PCC con los que son sensibilizadas las placas de ELISA. Lo anterior lleva a establecer que una vez seleccionado un equipo, se deberá mantener por el mayor tiempo posible, para de esta manera asegurar la menor variabilidad en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

Tabla 5 Coeficientes de correlación de los títulos de los anti-PCC detectados con tres equipos comerciales.

Grupo	Coeficiente de correlación		
	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
Sujetos sanos	0.510	0.738	0.397
Pacientes con artritis temprana	0.761	0.414	0.650
Pacientes con AR tardía	0.812	0.751	0.862

1 = ED, Immunoscan RA de la marca Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden.

2 = IN, Quanta Lite CCP IgG ELISA de la marca INOVA Diagnostics, Inc.

3 = EI, Anti-CCP ELISA de la marca Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG.

7.4 Establecimiento de los valores de referencia para la detección del FR (isotipos IgG, IgA e IgM) y de los anticuerpos anti-PCC.

Para conocer el rendimiento global de cada prueba y elegir los valores de referencia se construyeron curvas ROC, en las cuales se graficó el valor complementario de la especificidad (en el eje de las ordenadas) contra la sensibilidad (en el eje de las abscisas).

En el análisis de las curvas ROC el área bajo la curva (Abc) indica el rendimiento global de la prueba. De esta manera entre más se acerca el valor del área a 1.0 el rendimiento de la prueba es mayor. La Fig. 1 muestra las curvas ROC de los títulos de FR-IgG detectados con los equipos de Orgentec e INOVA en los sueros de los pacientes con artritis temprana (Abc = 0.86 y 0.822 respectivamente) y con AR tardía (Abc = 0.937 y 0.863 respectivamente). Las curvas con mayor área fueron las de los equipos de Orgentec.

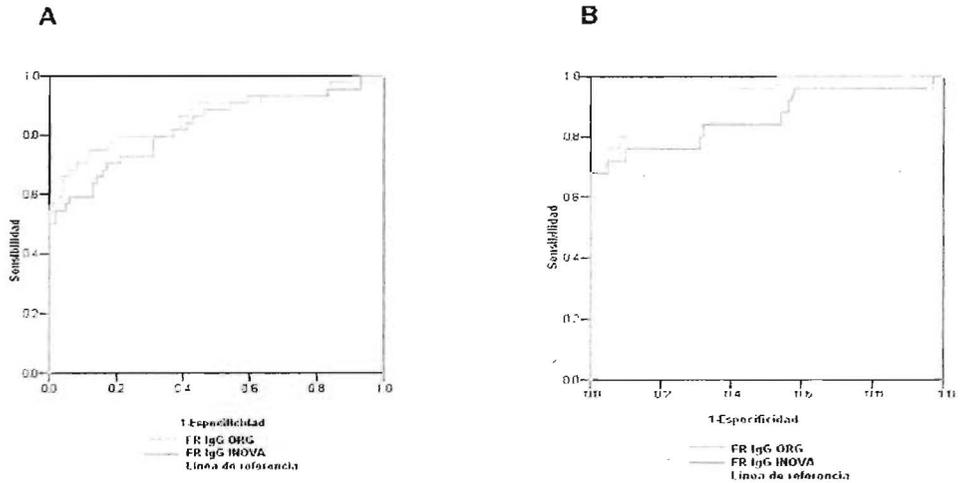


Fig. 1 Curvas ROC para FR de isotipo IgG. A. Artritis Temprana. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.86; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.822. B. AR tardía. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.937; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.863.

La Figura 2 muestra las curvas ROC de los títulos de FR-IgA detectados con los equipos de Orgentec e INOVA en los sueros de los pacientes con artritis temprana ($Abc = 0.832$ y 0.891 respectivamente) y con AR tardía ($Abc = 0.975$ y 0.945 respectivamente). Las curvas con mayor Abc fueron las de los equipos de INOVA (0.891) para artritis temprana y Orgentec para AR tardía (0.975).

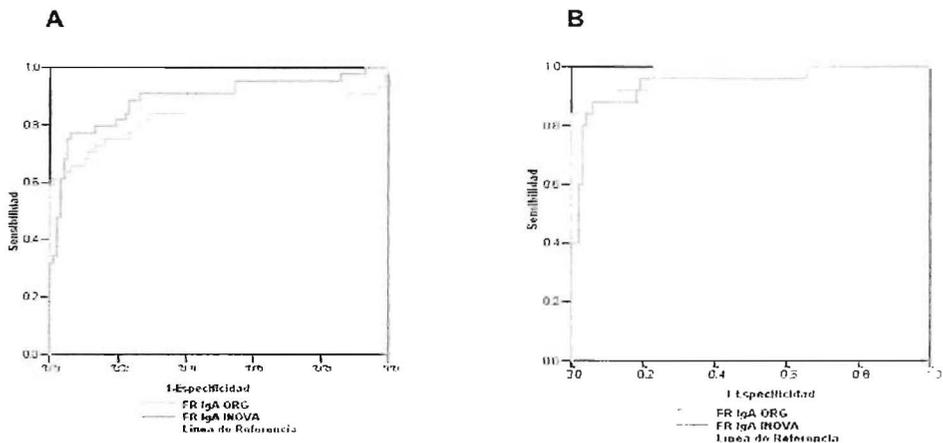


Fig 2. Curvas ROC para FR de isotipo IgA. A. Artritis temprana. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.832; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.891. B. AR tardía. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.975; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.945.

La Fig. 3 muestra las curvas ROC de los títulos de FR-IgM detectados con los equipos de Orgentec e INOVA en los sueros de los pacientes con artritis temprana ($Abc = 0.931$ y 0.867 respectivamente) y con AR tardía ($Abc = 0.984$ y 0.936 respectivamente). Las curvas con mayor área fueron las de los equipos de Orgentec.

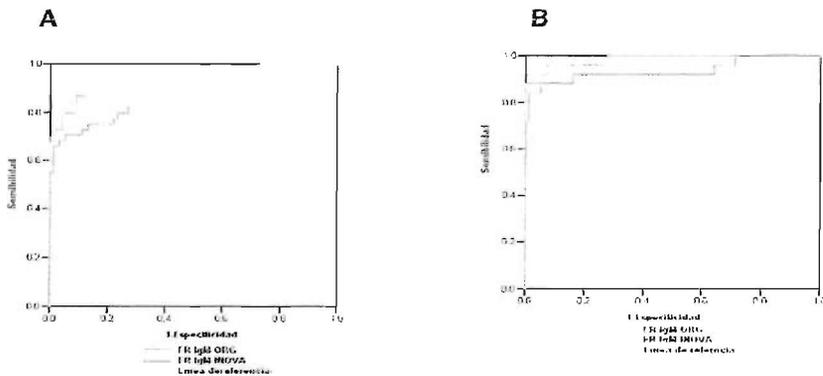


Fig 3. Curvas ROC para FR de isotipo IgM. A. Artritis temprana. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.931; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.867. B. AR. Área bajo la curva equipo de Orgentec = 0.984; área bajo la curva equipo de INOVA = 0.936.

La Figura 4 muestra las curvas ROC para los anti-PCC. En el grupo de pacientes con artritis temprana las Abc fueron: $ED = 0.818$; $IN = 0.81$ y $EI = 0.796$. En el grupo de pacientes con AR tardía, las Abc fueron: $ED = 0.987$; $IN = 0.939$ y $EI = 0.981$. Las curvas con mayor Abc tanto para artritis temprana como para AR tardía fueron las de los equipos de ED (0.818 y 0.987 respectivamente).

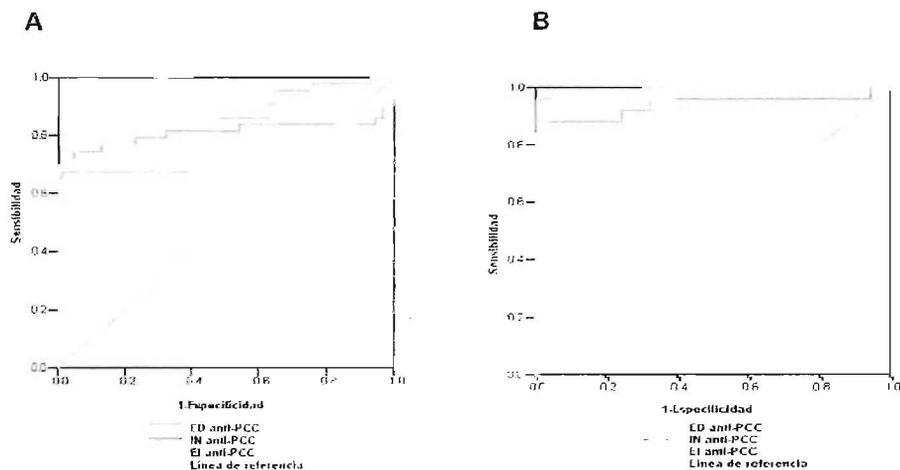


Fig 4. Curvas ROC para anticuerpos anti PCC. A. Artritis temprana. Área bajo la curva equipo ED = 0.818; área bajo la curva equipo IN = 0.81; área bajo la curva equipo EI = 0.796. B. AR tardía. Área bajo la curva equipo ED = 0.987; área bajo la curva equipo IN = 0.939; área bajo la curva equipo EI = 0.981.

En resumen: las mejores áreas bajo la curva se obtuvieron con los equipos de Orgentec para FR de los tres isotipos y ED para anti-PCC. A partir de dicho análisis, se establecieron los valores de referencia con la más alta sensibilidad y especificidad.

7.5 Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo (VPN) y positivo (VPP) se estimaron a partir del análisis de las curvas ROC. Los resultados se obtuvieron al analizar a los 25 pacientes con AR tardía y a los 44 pacientes con artritis temprana. La tabla 6 muestra la sensibilidad, especificidad y valores de referencia (VR) para FR isotipos IgG, IgA e IgM en ambos grupos de pacientes.

Tabla 6. Sensibilidad, especificidad y valores de referencia del FR

Grupo	ISOTIPO					
	IgG		IgA		IgM	
	Sensibilidad %	Especificidad %	Sensibilidad %	Especificidad %	Sensibilidad %	Especificidad %
Artritis temprana	70.5	91.0	75.0	83.8	81.8	91.0
		VR ≤ 35.5 U/mL		VR ≤ 13.0 U/mL		VR ≤ 15.5 U/mL
Artritis reumatoide	80.0	92.0	84.0	89.0	88.0	99.0
		VR ≤ 35.5 U/mL		VR ≤ 26.5 U/mL		VR ≤ 27.0 U/mL

FR-IgG: el valor de referencia se estableció en 35.5 U/mL. Con dicho valor la sensibilidad y especificidad de la prueba fue del 70.5 y 91.0% respectivamente en artritis temprana, y del 80.0 y 92.0% respectivamente, en AR tardía.

FR-IgA: se establecieron dos valores referencia, uno para artritis temprana en 13.0 U/mL (sensibilidad: 75.0%, especificidad: 83.8%) y otro en AR tardía en 26.5 U/mL (sensibilidad: 84.0%, especificidad: 89.0%).

FR-IgM: se establecieron dos valores de referencia, uno para artritis temprana en 15.5 U/mL (sensibilidad: 81.8%, especificidad: 91.0%) y otro para AR tardía en 27.0 U/mL (sensibilidad: 88.0%, especificidad: 99.0%).

La tabla 7 muestra los valores de sensibilidad, especificidad y valores de referencia de los anti-PCC. Para el grupo de artritis temprana el valor de referencia se estableció en 25.0 U/mL con una sensibilidad de 67.4% y especificidad de 98.9%, VPP de 96.0 % y VPN de 99.0 % (sensibilidad de 65.0 % y especificidad de 99.0%). En el grupo de pacientes con AR tardía el valor de referencia se estableció en 36.5 U/mL con una sensibilidad de 84.0 % y una especificidad de 98.9 %.

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad y valor de referencia de los anti-PCC

Grupo	anti-PCC		Valor de referencia U/mL
	Sensibilidad %	Especificidad %	
Artritis temprana	67.4	98.9	≤ 25.0
Artritis reumatoide	84.0	98.9	≤ 36.5

Con los valores de referencia anteriormente establecidos para FR-IgG, FR-IgA, FR-IgM y a-PCC los controles sanos fueron positivos en el 8.0%, 15.2%, 9.0% y 1.0%, respectivamente.

En el grupo de artritis temprana, 70.5% tuvieron FR-IgG positivo vs. 80.0% de los pacientes con AR tardía, $p=0.38$; 72.7% tuvieron FR-IgA positivo vs. 84.0%, $p=0.29$; 79.5% tuvieron FR-IgM vs. 88.0%, $p=0.37$ y 63.9% tuvieron anti-PCC positivos vs. 84.0% de los pacientes con AR tardía, $p=0.09$.

7.6 Curvas de distribución del FR (isotipos IgG, IgA e IgM)

Los resultados presentados se obtuvieron a partir de los equipos seleccionados en el análisis de las Curvas ROC. Para FR (isotipos IgG, IgA e IgM) el equipo de Orgentec y para anti-PCC el equipo ED.

7.6.1 FR-IgG

Sanos: el mayor porcentaje de sujetos sanos tuvo valores entre 0.0 y 60.0 U/mL (mediana = 13.9 U/mL [8.2-91.7]). Los títulos más altos estuvieron alrededor de las 10.0 U/mL.

Pacientes: la mayoría de los pacientes con artritis temprana tuvo valores alrededor de las 100.0 U/mL (mediana = 109.6 U/mL [8.7-1003.2]) y la mayoría de los pacientes con AR tardía valores alrededor de 200.0 U/mL (mediana = 97.9 U/mL [13.5-1042.9]; $p=1$). Figura 5.

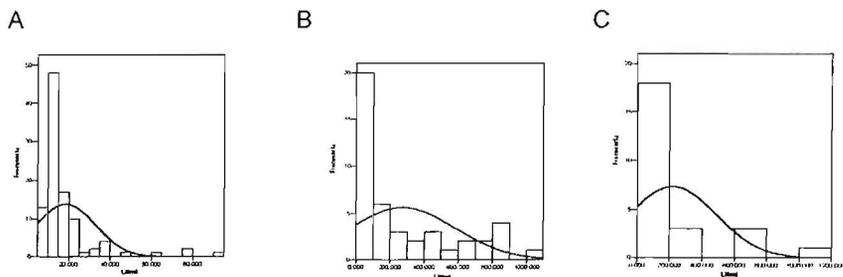


Fig. 5 Gráficas de distribución de los títulos de FR-IgG detectados con el equipo Orgentec de la casa Diagnostika GmbH. A. Sujetos sanos. B. Pacientes con Artritis temprana. C. Pacientes con AR tardía.

7.6.2 FR-IgA

Sujetos sanos: el mayor porcentaje se concentró entre los valores 5.0 y 30.0 U/mL (mediana = 10.3 U/mL [6.1-28.6].) Los títulos más altos estuvieron alrededor de 30.0 U/mL.

Pacientes: la distribución de los títulos de FR-IgA en los pacientes con artritis temprana alcanzó valores de hasta 1231.2 U/mL, con una alta frecuencia entre las 0.0 y las 100.0 U/mL (mediana = 41.1 U/mL [5.5-1231.2]). Los pacientes con AR tardía mostraron títulos más altos que los pacientes con artritis temprana (mediana = 83.7 U/mL [11.7-1401.3]; $p = 0.03$). Figura 6.

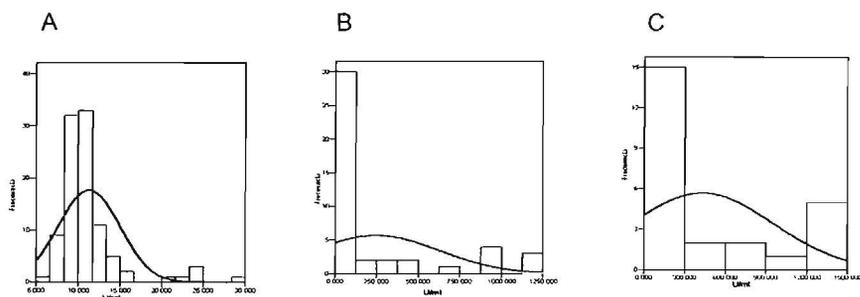


Fig. 6 Gráficas de distribución de los títulos de FR-IgA detectados con el equipo Orgentec de la casa Diagnostika GmbH. A. Sujetos sanos. B. Pacientes con Artritis temprana. C. Pacientes con AR tardía.

7.6.3 FR-IgM

Sanos: el mayor porcentaje tuvo valores entre 0.0 y 20.0 U/mL (mediana = 8.5 U/mL [6.7-28.7]). Los títulos más altos estuvieron alrededor de las 30.0 U/mL.

Pacientes: en pacientes con artritis temprana el título mayor fue de 1212.7 U/mL con una alta frecuencia de pacientes con títulos alrededor de las 120.0 U/mL (mediana = 119.7 U/mL [7.8-1212.7]). En pacientes con AR tardía la mediana fue de 228.9 U/mL [9.9-1384.9]. No hubo diferencias entre ambos grupos de pacientes, $p=0.13$. Fig 7.

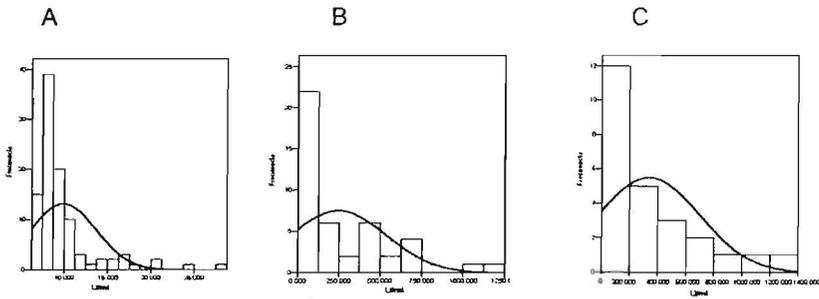


Fig. 7. Gráficas de distribución de los títulos de FR-IgM detectados con el equipo Orgentec de la casa Diagnostika GmbH. A. Sujetos sanos. B. Pacientes con Artritis temprana. C. Pacientes con AR tardía.

De acuerdo a las distribuciones que presentaron los valores de los anticuerpos anti-PCC y FR (isotipos IgG, IgA e IgM) los resultados fueron analizados con pruebas no paramétricas.

7.6.4 Curvas de distribución de anti-PCC

La Figura 8 muestra la frecuencia de distribución de los títulos de anti-PCC para cada uno de los grupos estudiados: sanos (Fig. 8 A), pacientes con artritis temprana (Fig. 8 B) y pacientes con AR tardía (Fig. 8 C). Sobre las gráficas se sobreponen las curvas de distribución normal.

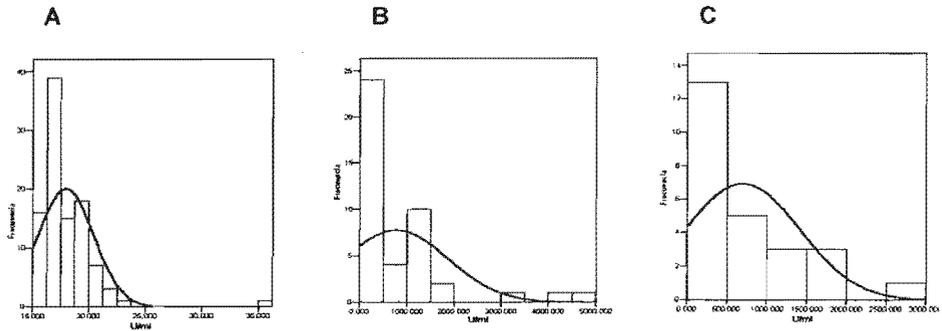


Fig. 8 Graficas de distribución de los títulos de anti-PCC detectados con el equipo ED Immunoscan RA. (Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden). A. Sujetos sanos. B. Pacientes con Artritis temprana. C. Pacientes con AR tardía

La mayor parte de los sujetos sanos tuvieron títulos entre 0.0 y 25.0 U/mL (mediana = 17.0 U/mL [15.1-36.2]). Los títulos más altos fueron de 35.0 U/mL.

La mediana de los pacientes con artritis temprana para anti-PCC fue 235.3 U/mL y el valor más alto de 4957.6 U/mL. La mediana de los pacientes con AR tardía para anti-PCC fue 445.3 U/mL y el valor más alto de 2680.6 U/mL. La diferencia entre ambos grupos de pacientes no fue significativa ($p=0.22$).

7.7 Pacientes con artritis temprana: actividad y su correlación con la serología

Se clasificaron los pacientes con artritis temprana de acuerdo a la presencia o ausencia de anti-PCC y FR. Se comparó la actividad de la enfermedad en los diferentes grupos. La tabla 8 resume los datos más relevantes. Los pacientes con anti-PCC tuvieron mayor número de criterios para AR del CAR, mayor actividad clínica valorada por DAS28 y EVAG, peor funcionalidad valorada por HAQ y mayor actividad serológica evaluada por VSG y PCR, que los pacientes que carecían de estos anticuerpos.

Los pacientes con FR-IgG positivo y FR-IgA positivo tuvieron mayor actividad serológica de la artritis (medida por PCR y VSG) que quienes carecían de tales anticuerpos.

El número de criterios para AR del CAR fue mayor en quienes tenían anti-PCC, FR-IgG, FR-IgA ó FR-IgM, que en quienes carecían de cualquiera de los anteriores.

Para el análisis de regresión múltiple se consideraron únicamente seis de los siete criterios para AR del CAR (se omitió el criterio de FR). Los pacientes con ambos

anticuerpos, anti-PCC y FR-IgA, tuvieron 3.5 veces mayor probabilidad de tener un número mayor de criterios (cinco o seis) que los pacientes anti-PCC y FR-IgA negativos, $p=0.05$.

Tabla 8. Análisis de las características clínicas, demográficas y de laboratorio de los pacientes con artritis temprana.

Característica	Anti-PCC			FR-IgG			FR-IgA			FR-IgM		
	N = 28	N = 15	P	N = 31	N = 13	P	N = 31	N = 13	P	N = 12	N = 9	P
	+	-		+	-		+	-		+	-	
Edad*	40 19-79	34 19-73	0.81	34 18-79	42 19-75	0.11	35 19-79	42.5 19-75	0.11	38 19-79	44 23-75	0.13
Sexo femenino %	78.6	93.3	0.22	80.6	92.3	0.34	81.3	91.7	0.40	85.7	78.8	0.57
Tiempo de evolución (meses)*	5.3 0.8-12	6.3 0.5-12	0.507	5.7 0.8-12	4.6 0.46-10	0.51	5.7 0.8-12.5	4.8 0.46-10	0.45	5.7 0.80-12	5.7 0.46-8.2	0.32
N°. de criterios*	6 3-7	5 1-6	0.004	6 3-7	4 1-6	0.001	6 3-7	4 1-6	0.001	6 3-7	5 1-6	0.03
DAS 28*	6.4 3.6-8.4	5.4 3.8-8.7	0.04	6.4 3.6-8.7	5.2 3.6-8.7	0.06	6.3 3.6-8.7	5.3 3.8-8.7	0.28	6.1 3.6-8.7	5.4 3.8-8.7	0.80
VSG (mm/hr)*	28 10-105	18 3-55	0.05	31 9-105	17 3-51	0.002	30.5 9-105	16.5 3-63	0.005	28 9-105	17 3-53	0.20

DAS28 = índice que valora actividad. VSG = velocidad de sedimentación globular.

*Se representa: mediana (límite inferior-límite superior).

Tabla 8. Análisis de las características clínicas, demográficas y de laboratorio de los pacientes con artritis temprana
(continuación.....)

Característica	Anti-PCC			FR-IgG			FR-IgA			FR-IgM		
	N = 28	N = 15	P	N = 31	N = 13	P	N = 31	N = 13	P	N = 12	N = 9	P
	+	-		+	-		+	-		+	-	
PCR (mg/dL)*	1.42 0.0-8.5	0.16 0.0-9.8	0.005	1.6 0.0-9.81	0.163 0.0-8.46	0.002	1.4 0.0-9.8	0.18 0.0-8.5	0.02	1.05 0.0-8.46	0.16 0.0-9.81	0.08
HAQ*	1.4 0.0-3	0.63 0.0-1.9	0.02	1.5 0.0-3	0.85 0.0-2.62	0.03	1.45 0.0-3	0.86 0.0-2.62	0.20	1.37 0.0-3	0.87 0.0-2.62	0.16
Art. Inf. / 28*	12 2-25	10 3-17	0.06	14 2-28	10 3-24	0.15	13 2-28	10 3-24	0.48	12 2-28	11 3-24	0.85
Art. Dol. / 28*	14 2-28	12 4-18	0.11	15 2-28	12 4-28	0.16	14.5 2-28	12 4-28	0.42	13 2-28	12 4-28	0.73
EVAD*	64 7-97	38 14-87	0.08	58.5 7-97	38 14-81	0.26	57.5 7-97	58.5 14-81	0.86	58 7-97	54 14-73	0.46
EVAG*	68 11-95	33 0-92	0.02	68 11-95	36 0-95	0.11	61 11-95	43.5 0-95	0.56	62 0-95	35 6-95	0.33

PCR = Proteína C reactiva; HAQ = cuestionario que valora funcionalidad. Art. Inf/28 = N° de articulaciones inflamadas, de 28 evaluadas. Art. Dol/28 = N° de articulaciones dolorosas, de 28 evaluadas. EVAD = escala visual análoga de dolor. EVAG = escala visual análoga del estado general de la artritis.

*Se representa: mediana (límite inferior-límite superior).

Discusión

La parte medular del trabajo consistió en comparar tres equipos comerciales de segunda generación para la cuantificación de anticuerpos anti-PCC mediante ensayo inmunoenzimático. Simultáneamente, en los mismos sueros se realizó la comparación de dos equipos para cuantificar actividad de FR de isotipos IgG, IgA e IgM.

En general los procedimientos fueron de fácil manejo. Sin embargo, el equipo **IN** Quanta Lite CCP IgG de la marca INOVA Diagnostics, Inc presentó un inconveniente, ya que la solución de lavado contenía un colorante el cual quedó depositado en las mangueras del equipo automatizado DSX. Debido a lo anterior se generaron serios problemas ya que se contaminaron otros procedimientos que habitualmente se llevan a cabo en el laboratorio de inmunología del INNSZ. Por otra parte el control negativo del equipo **EI** Anti-CCP ELISA de la marca Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG dio valores muy altos (esperado menor de 4.5 U/mL, observado 50.2 U/mL) lo cual sugirió un pobre control de calidad. Con el equipo **ED** Immunoscan RA de la marca Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden no se presentaron problemas. En general el manejo de los dos equipos para la detección de FR fue sencillo y sin inconvenientes.

En lo que respecta a los coeficientes de correlación entre los tres equipos que detectan anticuerpos anti-PCC y los dos equipos que miden la actividad de FR las mejores correlaciones se obtuvieron en los pacientes que presentaban AR tardía, ya que fueron los que en general tuvieron títulos más altos de todos los anticuerpos. Para la detección de los anticuerpos anti-PCC en sujetos sanos el coeficiente de correlación más bajo fue el obtenido entre los equipos de **IN** INOVA y **EI** Euroimmun y el más alto entre los equipos **ED** Immunoscan RA (Euro-Diagnostica) y **EI** Anti-CCP ELISA (Euroimmun). En los pacientes con artritis temprana, el coeficiente de correlación más bajo lo presentó la comparación de los equipos **ED** Immunoscan RA y **EI** Anti-CCP ELISA (Euroimmun). y la más alta la de los equipos **ED** Immunoscan RA e **IN** INOVA. En pacientes con AR tardía la mayor concordancia se observó entre los equipos de **IN** INOVA y **EI** Euroimmun. En general las correlaciones entre los diferentes equipos fueron pobres especialmente en las poblaciones en quienes los

títulos de anticuerpos fueron bajos o medios. Lo anterior implica que en la medida de lo posible debe de usarse un único equipo con el fin de minimizar las variaciones de origen técnico en la detección de los anticuerpos arriba descritos. Esto sería de especial relevancia en el seguimiento de los pacientes con artritis en quienes los niveles de anticuerpos pudieran modificarse con el curso de la enfermedad.

En ambos grupos de pacientes (artritis temprana y AR tardía) las mejores áreas bajo la curva para los tres isotipos de FR (IgG, IgA e IgM) se obtuvieron con el equipo de Orgentec (Abc= 0.86, 0.832, 0.931 para artritis temprana y Abc= 0.937, 0.975, 0.984 para AR tardía, respectivamente). En los mismos grupos, las mejores Abc para anti-PCC se obtuvieron con el equipo ED Immunoscan RA (Abc= 0.818 y 0.987 respectivamente).

Una vez seleccionado el mejor equipo para cada prueba se determinaron los valores de referencia y se calculó la sensibilidad y especificidad. Es importante señalar que se determinaron valores de referencia para los pacientes con artritis temprana y para los pacientes con AR tardía ya que ambos grupos se analizaron de manera independiente. En todos los casos, los pacientes con artritis temprana tuvieron los valores de referencia más bajos, mismos que sugerimos deben de usarse para fines de diagnóstico.

El valor de referencia para FR-IgG fue de 35.5 U/mL (sensibilidad de 70.5% y especificidad de 91.0%), para FR-IgA de 13.0 U/mL (sensibilidad de 75% y especificidad de 83.9%) y para el FR-IgM de 15.5 U/mL (sensibilidad del 81.8% y especificidad de 91.0%). De manera relevante, los valores de referencia encontrados difirieron de los indicados en el equipo Orgentec (≥ 20 U/mL) lo cual cuestiona la validez de los valores de referencia sugeridos por la compañía en diferentes poblaciones. De los tres isotipos el FR-IgM tuvo la mayor sensibilidad y especificidad, seguido por el FR-IgA, para ambos grupos de pacientes como ha sido reportado en la literatura por algunos autores. No obstante los valores de sensibilidad para FR-IgM, en nuestro estudio, fueron superiores^{27, 30}. Algunos factores que pudieran explicar dichas diferencias son el origen étnico de las poblaciones estudiadas, la variabilidad en la temporalidad a la hora de definir "artritis temprana" o la inclusión de diferentes entidades en el diagnóstico de artritis temprana. A este respecto cabe mencionar que la gran mayoría de los pacientes de la clínica de artritis temprana

autores ²⁹ se encontró una asociación entre la presencia de anticuerpos anti-PCC y FR-IgA y un mayor número de criterios del Colegio Americano de Reumatología para AR. Es decir, los pacientes que presentan ambos anticuerpos parecieron tener una AR más definida desde las etapas tempranas.

Conclusiones

1. Se compararon tres equipos de segunda generación para detectar anticuerpos anti-PCC en población sana, en pacientes con artritis temprana y en pacientes con AR tardía. El mejor equipo fue el **ED Inmunoscan RA** de la marca Euro-Diagnostica, Malmö, Sweden. En general, existió una mejor correlación entre títulos altos que entre medios y bajos. En pacientes con artritis temprana, la presencia de anticuerpos anti-PCC se correlacionó con mayor actividad clínica y serológica.
2. Se establecieron dos valores de referencia para anticuerpos anti-PCC. Para el grupo de artritis temprana el valor de referencia se estableció en 25.0 U/mL con una sensibilidad de 67.4% y especificidad de 98.9%, VPP de 96.0 % y VPN de 99.0 % (sensibilidad de 65.0 % y especificidad de 99.0%). En el grupo de pacientes con AR tardía el valor de referencia se estableció en 36.5 U/mL con una sensibilidad de 84.0 % y una especificidad de 98.9 %. Sin embargo, por facilidad en el manejo de los valores de referencia solo se usará el valor de 25.0 U/mL.
3. Detectamos además en los tres grupos la actividad de FR de isotipos IgG, IgA e IgM. El mejor equipo fue el de la compañía Orgentec (Disgnostika GmbH). Se observó una baja correlación entre los equipos a títulos bajos de cualquier isotipo de FR. Los pacientes con AR tardía tuvieron títulos mayores de FR-IgA que los pacientes con artritis temprana. La presencia de FR-IgG e IgA correlacionó con una mayor actividad serológica en los pacientes con artritis temprana.
4. En pacientes con artritis temprana, la presencia de anti-PCC y FR-IgA se asoció a un mayor número de criterios del Colegio Americano de Reumatología para AR, es decir con una AR mejor definida.

Bibliografía

1. Hochberg MC, Spector TD. Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: Update. *Epidemiol Rev* 1990; 12:147-252.
2. Alarcón GS. Epidemiología de las enfermedades reumáticas. En: Lience E, ed. *Patología Reumatológica básica*. Barcelona, Idepsa, 1981; 1-9.
3. Wordsworth P. The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:62-65.
4. Deighton CM, Walker DJ. The familial nature of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:62-65.
5. Pascual Gómez E. Manifestaciones clínicas articulares. Arán, ed. *Tratado de Reumatología*. España. 1998; 437-438.
6. Gaalen F.A, Linn-Rasker S. P., Venrooij W. J. Jong B. A., Breedveld F. C. Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis. *Arthritis Rheum*; 2004; 50:709-715.
7. Shelleken, G., Visser, H., De Jong, B. Van Den Hoogen, F., Hazes, J., The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 1999; 17:689-697.
8. Xiaofenz, Maixing, Xinping Tian, Xiodan Gan, Yanping Shi, Qinfang Song. Diagnostic Value of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2003; 30:1451-5.
9. Arnet FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31:315-324.
10. Benedek TG, Rodnan GP. A brief history of the rheumatic diseases. *Bull Rheum Dis*. 1982; 32:93-102.
11. Fraser K. The Waaler-Rose Test: Anatomy of the eponym. *Sem Arthritis Rheum*. 1998; 18:61-71.
12. Kunkel HG, Franklin EC, Muller-Eberhard HJ. Studies on the isolation and characterization of the isolation and characterization of the "rheumatoid factor". *J Clin Invest*. 1959; 38:424-434.

13. Kroot EJ de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinates peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1831-5.
14. Nijenhuis Suzane, Albert J.W. Zendman, Vossenaar, Ger J.M. Pruijn, Walther J. Van Venrooij Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clinica Chimica Acta* 350 (2004) 17-34.
15. Vallbrach I, Rievber J, Oppermann. 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.
16. Nienhuis RLF, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The perinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis* 1964; 23:302-5.
17. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med J* 1979; 2:97-9.
18. Sebbag M, Simon M, Vicent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95:2672-9.
19. Schellekens GA, De Jong BA, Van den Hoogen FH, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95:2672-9.
20. Gómez Centeno A. Anticuerpos antipeptidos citrulinados en la artritis reumatoide. *Rev Esp Reumatol* 2004;31(4):165-8,
21. Baeten D, Peene I, Union A, Mehehus L, Seebah M, Serre G, et al. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2555-62.
22. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MMA, van der Heijden A, Senu T, van den Berg WB. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2489-500.
23. Gregg J Silverman and Denis A Carson. Roles of cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 5 (Suppl 4): S1-S6. 2003.

24. Vossenaar ER, Zendman AJ, Van Venrooij WJ. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:1-5.
25. Bizzarro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic Accuracy of the Anti-Citrullina Antibody Assay for Rheumatoid Arthritis. *Clin Chem* 2001; 47:1089-93.
26. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper H, van Leeuwen MA, van de Putte LB. Modified Disease Activity Scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:44-8.
27. Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinate peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004; 63: 1079-84
28. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts disease course during 3 year in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 1085-9.
29. Solbriitt Rantapaa-Dahlqvist, Ben A.W de Jong, Ewa Berglin, Goran Hallmans. Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2741-2749.
30. Nielen Markus M.J. Schardenburg Dirkjan van. Reesink Henk W. Habibuw Mound R. Vandenbruke Jan P. Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 50:380-386.
31. van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Ahoguen FHJ, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002;4:87-93.

ANEXOS

1. CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD HAQ.

Versión validada al español.

En esta sección nos interesa conocer de qué forma afecta su enfermedad su capacidad para desempeñar sus actividades en la vida diaria. Puede agregar cualquier comentario que crea oportuno al dorso de esta página.

Por favor, marque con una cruz la respuesta que mejor describa su capacidad habitual.

DURANTE LA SEMANA PASADA:

Vestirse y arreglarse:

¿Puede Usted:	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
1.- Vestirse solo(a), incluyendo amarrarse las agujetas de los zapatos y abrocharse los botones?				
2.- Lavarse el cabello?				

Levantarse

¿Puede Usted:	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
3.- levantarse de una silla sin apoyarse?				
4.- acostarse y levantarse de la cama?				

Comer

¿Puede Usted	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
5.- cortar la carne en el plato?				
6.- levantar una taza o vaso lleno hasta la boca?				
7.- abrir un cartón nuevo de leche?				

Caminar

¿Puede Usted	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
8.- caminar afuera de su casa sobre un terreno plano?				
9.- subir cinco escalones?				

Si utiliza habitualmente algún UTENSILIO O APARATO DE AYUDA para hacer alguna de sus actividades arriba mencionadas, por favor, márkelo con una cruz en la siguiente lista:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1.- Bastón | 5.- Aparatos utilizados para vestirse (gancho para abrocharse los botones, aparato para subir cierres, calzador etc) |
| 2.- Andador | 6.- Utensilios adaptados para cocinar o comer. |
| 3.- Muletas | 7.- Silla especialmente adaptada. |
| 4.- Silla de ruedas | |
| 8.- Otros (especifíquelos: _____) | |

Si en alguna de estas actividades suele necesitar LA AYUDA DE OTRA PERSONA por favor, márkela con una cruz en la lista siguiente:

- | | |
|---------------------------|---------------|
| 9.- Vestirse y arreglarse | 11.- Comer. |
| 10.- Levantarse | 12.- Caminar. |

Higiene

¿Puede Usted:	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
10.-lavarse y secarse el cuerpo?				
11.-abrir y cerrar las llaves del agua?				
12.-sentarse y levantarse del inodoro?				

Alcance

¿Puede Usted:	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
13.-Alcanzar y bajar una bolsa de 2 kg que esté por arriba de su cabeza?				
14.- Agacharse para recoger ropa del suelo?				

Agarrar

¿Puede Usted:	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
15-abrir las puertas de un auto?				
16.- Abrir frascos que ya habían sido abiertos?				
17.- Abrir y cerrar las canillas?				

Actividades.

¿Puede Usted	Sin ninguna dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	No puedo hacerlo
18-Hacer mandados e ir de compras?				
19.- Entrar y salir de un auto?				
20.- Hacer tareas domésticas (barrer, arreglar el jardín)?				

Si utiliza habitualmente algún UTENSILIO O APARATO DE AYUDA para hacer alguna de sus actividades arriba mencionadas, por favor, márkelo con una cruz en la siguiente lista:

- | | |
|---|---|
| 13.- Asiento elevado para el inodoro | 17.- Aparatos con mango largo para alcanzar cosas |
| 14.- Asiento para bañarse | 18.- Utensilios con mango largo en el baño (cepillo para la espalda, etc) |
| 15.-Abridor de frascos (para frascos ya abiertos) | 19.- Otros (especifique: _____) |

Si en alguna de estas actividades suele necesitar LA AYUDA DE OTRA PERSONA, por favor márkuela con una cruz en la lista siguiente:

- | | |
|-----------------------|------------------------------------|
| 20.- Higiene personal | 21.- Agarrar y abrir cosas |
| 22.- Alcanzar cosas | 23.- Mandados y tareas domésticas. |

Nombre y Firma del Paciente: _____.

2. ESCALA VISUAL ANÁLOGA PARA EL PACIENTE.

Ejemplo: Marque en la línea como se indica, el punto que mejor refleja su condición:

Sin dolor ----- **El peor dolor posible**

Coloque en la línea el punto donde Ud. considere que refleja en promedio el dolor que padece por la artritis durante la última semana.

Sin dolor ----- **El peor dolor posible**

Evaluación global del paciente respecto a la actividad de la patología. ¿Considerando todas las formas en que la artritis lo afecta, en promedio, cómo ha estado durante la última semana?.

Muy bien ----- **Muy mal**

Nombre y Firma del paciente _____

Nota: Esta hoja no debe ser vista por su médico tratante.