

Niveles de autoanticuerpos anti-péptidos carbamilados y citrulinados y su relación con índices de actividad clínica reumática en pacientes con artritis reumatoide temprana y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con artritis reumatoide.

Estudiante

Manuel Alejandro Ramos Casallas.

Asesores Externos

María Consuelo Romero Sánchez, Msc, Phd.

Leidy Lorena Chila Moreno, Bcl, Est. Msc.

Asesor Interno

Julián Esteban Muñoz Henao, Phd.



Introducción

Artritis Reumatoide

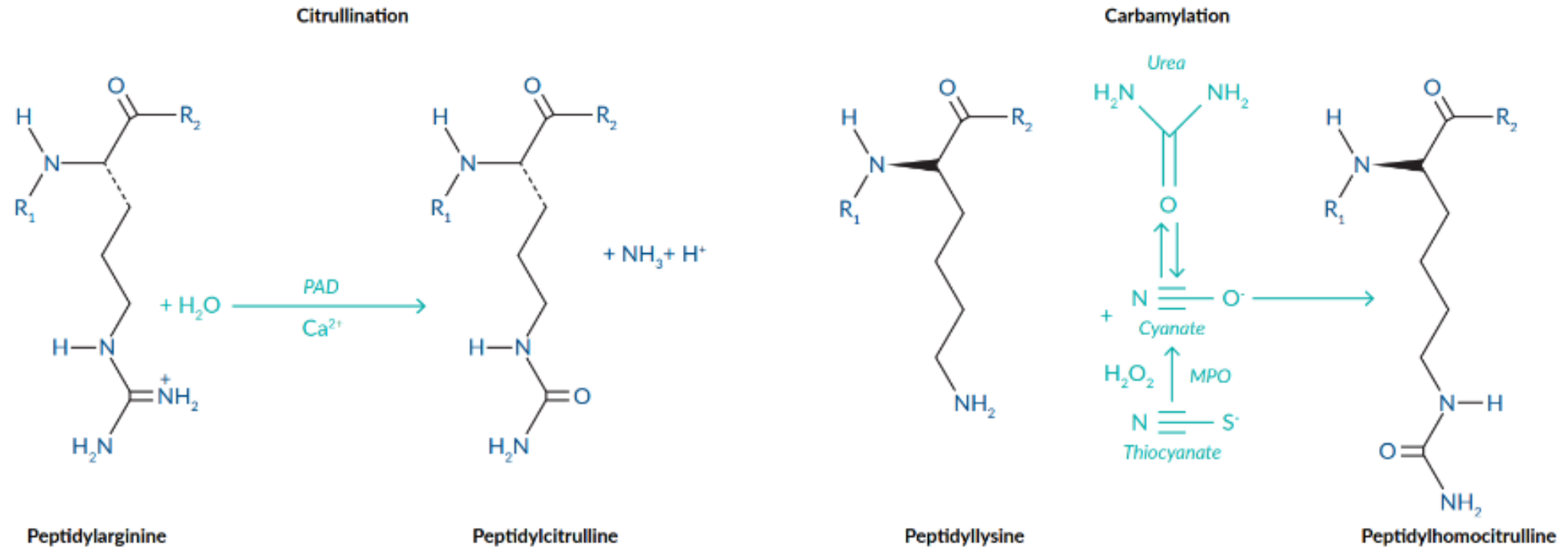
Enfermedad autoinmune cuya prevalencia a nivel mundial es cerca del 1% y afecta generalmente a las mujeres (Firestein, 2003).

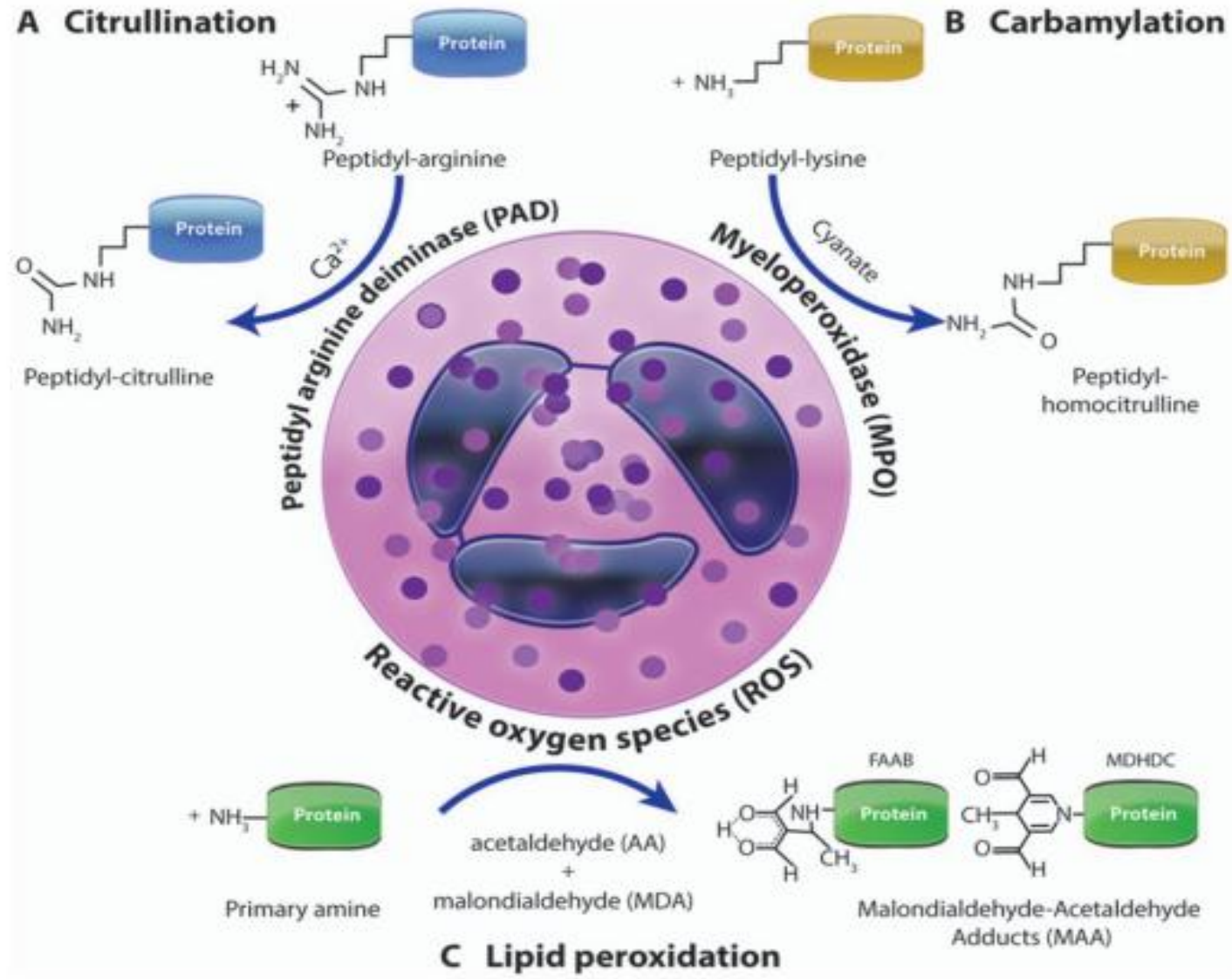
Consiste en la destrucción de articulaciones móviles (diartrodiales)

Se caracteriza por presentar un estadio crónico inflamatorio y la producción de autoanticuerpos

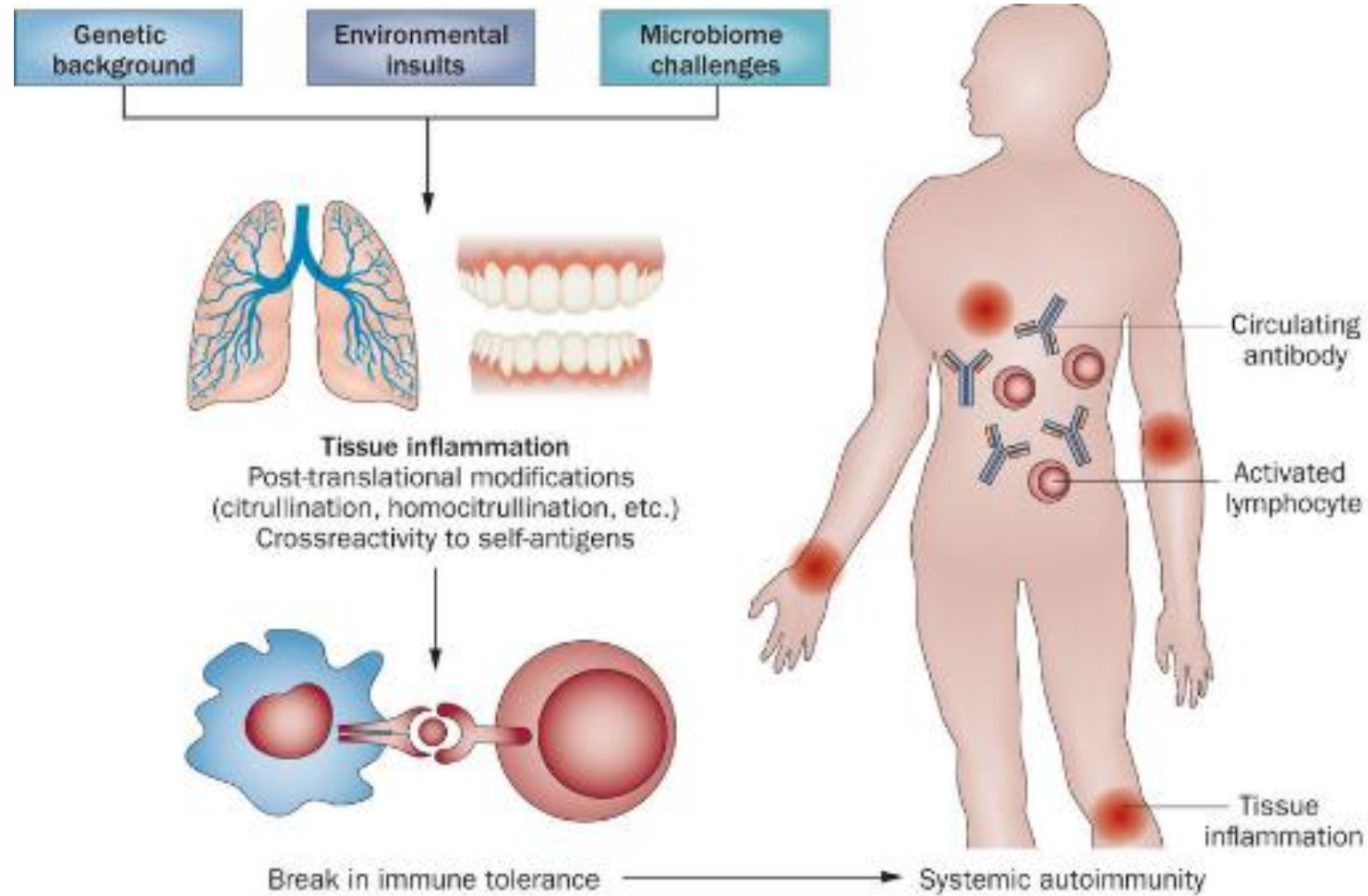


Modificaciones post-traduccionales





Hipótesis etiopatológica



Nature Reviews | Rheumatology

Clasificación Artritis Reumatoide

Table 3. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis

	Score
Target population (Who should be tested?): Patients who	
1) have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling)*	
2) with the synovitis not better explained by another disease†	
Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A–D; a score of $\geq 6/10$ is needed for classification of a patient as having definite RA)‡	
A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)#	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)**	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)††	
Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low-positive RF <i>or</i> low-positive ACPA	2
High-positive RF <i>or</i> high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Normal CRP <i>and</i> normal ESR	0
Abnormal CRP <i>or</i> abnormal ESR	1
D. Duration of symptoms§§	
<6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Pregunta de Investigación

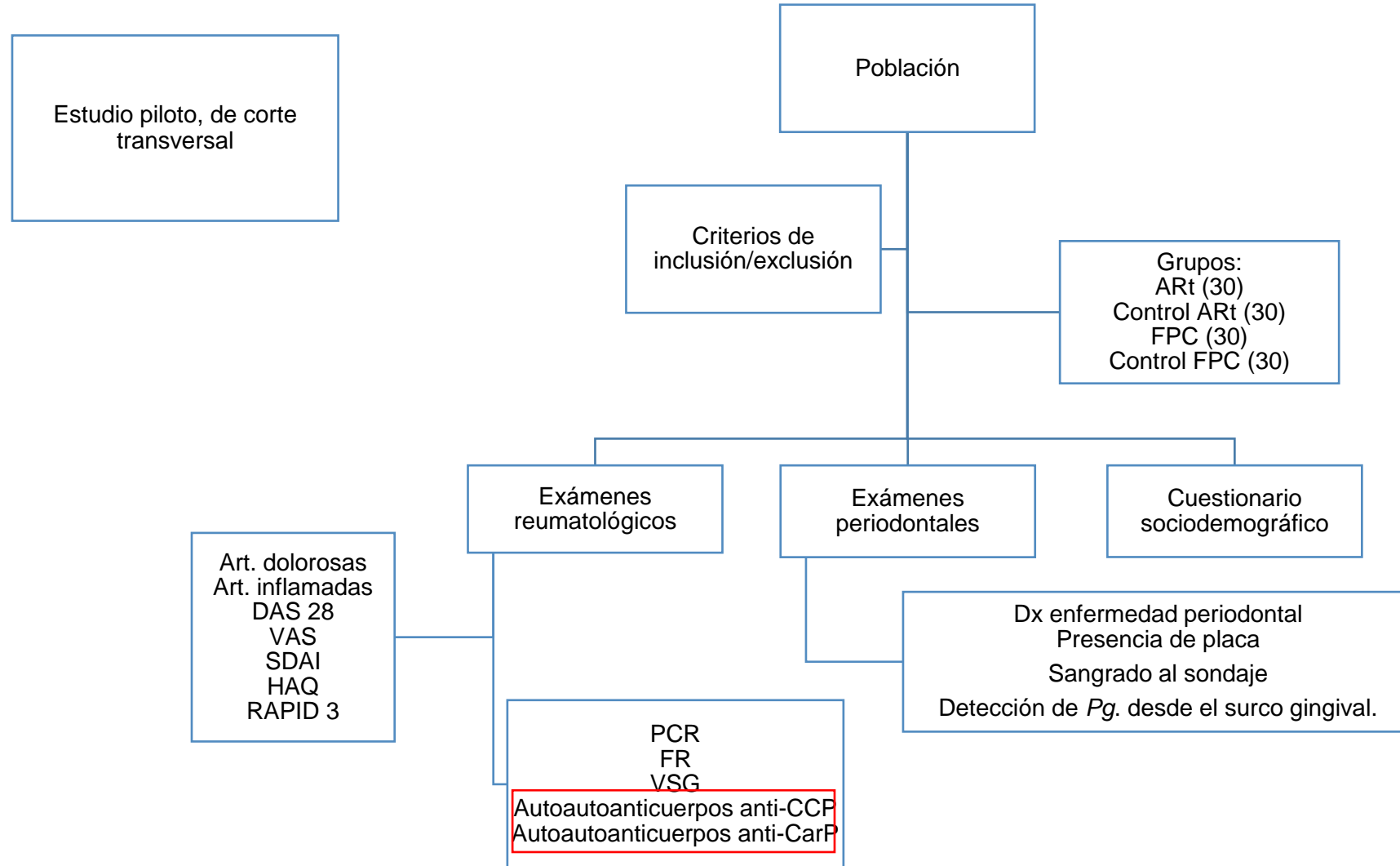
¿La presencia de autoanticuerpos anti-péptidos carbamylados está asociada a la actividad reumatológica en los pacientes con artritis reumatoide temprana e individuos con riesgo de desarrollar artritis reumatoide?

Objetivos

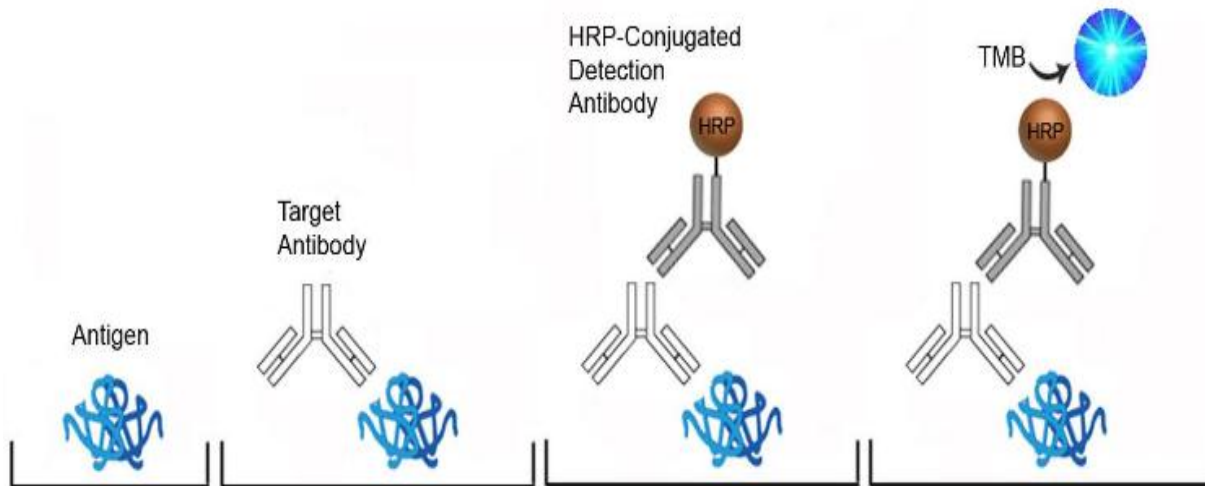
Objetivo General

- **Evaluar los niveles de autoanticuerpos anti-péptido carbamilo (anti-CarP) y citrulinado (anti-CCP) en pacientes con Artritis Reumatoide temprana (ARt) e individuos familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con artritis reumatoide (FPC) y su relación con índices de actividad reumática y periodontal, en el Hospital Militar Central de la ciudad de Bogotá.**

Materiales y Métodos



KIT ELISA CCP3 QUANTA Lite®



Tomado de: <https://www.lsbio.com/elisakits/human-anti-cyclic-citrullinated-peptide-antibody-elisa-kit-direct-elisa-ls-f10236/10236>

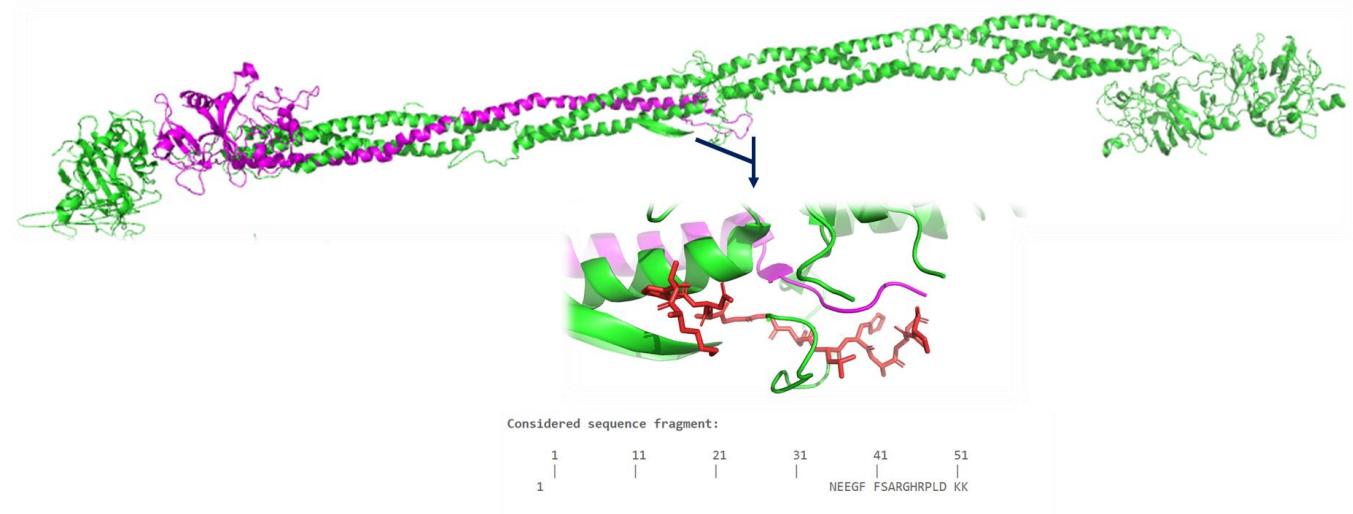


Tomado de: <https://i.ytimg.com/vi/8iugzaNckPk/maxresdefault.jpg>

ELISA- *in house* AUTOANTICUERPOS ANTI-CARP

Péptido sintético derivado de la cadena beta del fibrinógeno, en la posición 36-53 (18 mers):

- *NEEGFFSARGHRPLDKK (FibNorm)*
- *NEEGFFSA**Homo**GHRPLDKK (FibHomo)*



Masson-Bessiere C, et al. 2001
Verpoort K. N. et al. 2007.

Modelo tridimensional del fibrinógeno, con énfasis en la cadena beta (morado) y la ubicación del péptido utilizada durante el estudio. Figura realizada mediante ExPASy Bioinformatics Resource Portal y Pymol.
Autoría: Lorena Chila.

Sensibilización de las placas

Añadir 100µL/pozo del péptido, en concentración de 5 ug/mL

Cubrir la placa con papel termoadhesivo e incubar 16 horas a 4 °C.

Lavado

Con solución de lavado A, realizar 3 ciclos de 1 minuto cada uno

Bloqueo de sitios inespecíficos

Agregar 150 µL/pozo de solución de bloqueo e incubar 1 hora a temperatura ambiente

Descarta el sobrenadante

Procesamiento de las muestras

Añadir 100 µL/pozo de suero en dilución 1/50 o 1/100 e incubar 1 hora a 37°C

Con solución de lavado B, realizar 3 ciclos de lavado de 1 minuto cada uno

Agregar 100 µL/pozo del conjugado en dilución 1:10000, e incubar 1 hora a temperatura ambiente

Repetir el paso 2

Adicionar 100 µL/pozo de sustrato, permitiendo reaccionar durante 1 minuto

Añadir 100 µL/pozo de solución STOP para detener la reacción enzimática

Lectura e interpretación

Medir los valores de densidad óptica (DO) usando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm

Reactivos:

Diluyente péptido: PBS 1X +BSA 0.1%

Solución de lavado A: PBS 1X

Solución de bloqueo: PBS 1X + BSA 0.1%

Diluyente muestras/conjugado: PBS 1X/0.05% Tween/1% BSA

Solución de lavado B:PBS 1X + 0.05% Tween

Sustrato: TMB-H₂O₂

Solución STOP: Ácido sulfúrico 2M

Objetivos Específicos 1 y 2:

- **Establecer los niveles de autoanticuerpos anti-CarP** en pacientes con Artritis Reumatoide temprana (**ARt**) y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con Artritis Reumatoide (**FPC**).
- **Establecer los niveles de autoanticuerpos anti-CCP** en pacientes con Artritis Reumatoide temprana (**ARt**) y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con Artritis Reumatoide (**FPC**).

Resultados

Variable	ART 0,30 (100%)	Controles ART 0,30 (100%)	FPC 0,30 (100%)	Controles FPC 0,30 (100%)
Edad (Años)				
Media±DE	50,1±11,0	49,7±10,6	40,0±11,6	40,0 ±11,6
Sexo (%)				
Mujer	24 (80,0)	24 (80,0)	25 (83,3)	25 (83,3)
Hombre	6 (20,0)	6 (20,0)	5 (16,7)	5 (16,7)
Ocupación (%)				
Hogar	13 (43,3)	8 (26,6)	5 (16,6)	4 (13,3)
Independiente	4 (13,3)	0 (0,0)	6 (20,0)	0 (0,0)
Empleado	8 (26,6)	17 (56,6)	18 (60,0)	21 (70,0)
Pensionado	4 (13,3)	4 (13,3)	0 (0,0)	2 (6,6)
Estudiante	1 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	3 (10,0)
Estudios (%)				
Primaria	6 (20,0)	6 (20,0)	1 (3,3)	2 (6,6)
Bachillerato	11 (36,6)	7 (23,3)	8 (26,6)	6 (20,0)
Técnico	1 (3,3)	4 (13,3)	4 (13,3)	5 (16,6)
Universitario	12 (40,0)	13 (43,3)	17 (56,6)	17 (56,6)
Vivienda (%)				
Propia	25 (83,3)	21 (70,0)	16 (53,3)	16 (53,3)
Arrendada	4 (13,3)	8 (26,6)	6 (20,0)	12 (40,0)
Común	1 (3,3)	0 (0,0)	8 (26,6)	2 (6,6)
En alojamiento	0 (0,0)	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Estado civil (%)				
Casado	21 (70,0)	9 (30,0)	12 (40,0)	10 (33,3)
Soltero	2 (6,6)	8 (26,6)	16 (53,3)	13 (43,3)
Viudo	2 (6,6)	3 (10,0)	1 (3,3)	2 (6,6)
Unión libre	4 (13,3)	5 (16,6)	1 (3,3)	4 (13,3)
Separado	1 (3,3)	5 (16,6)	0 (0)	1 (3,3)
Comorbilidad (%)				
Presencia	16 (53,3)	16 (53,3)	14 (46,6)	9 (30,0)
IMC				
Media±DE	26,9±4,4	23,98±2,8	24,79±3,6	23,67±3,5
Fuma (%)				
Presencia	2 (6,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (10,0)
Fumó (%)				
Presencia	7 (23,3)	10 (33,3)	0 (0,0)	10 (33,3)
Fumador pasivo (%)				
Presencia	3 (10,0)	5 (16,6)	3 (10,0)	5 (16,6)

Wilder RL, Sternberg EM. 1990.
Ahmed SA, et al. 1999.

Feng J, et al. 2016.
Unriza-Puin S, et al. 2017.

Gremese E, et al. 2014.

Variable	ART	Controles ART	FPC	Controles FPC
	n:30 (100%)	n:30 (100%)	n:30 (100%)	n:30 (100%)
N° Art. dolorosas (%) Mayor a 1	24 (80,0)	8 (26,7)	15 (50)	5 (16,7)
N° Art. inflamadas (%) Mayor a 1	27 (90,0)	4 (13,4)	5 (16,7)	3 (10,0)
DAS 28 VSG (%) Media ± DE	3,9±1,2	2,1±1,2	1,9±1,0	1,8±1,2
DAS 28 PCR (%) Media ± DE	3,7±0,9	2,1±0,8	2,2±0,9	1,7±0,7
VSG mm/h Media ± DE	26,7±28,6	16,9 ± 23,4	7,2±6,1	14,7±22,3
PCR mg/L Media ± DE	20,0±35,37	4,0 ± 5,4	8,7±20,6	3,2±6,3
FR UI/L Media ± DE	44,9±55,4	16,05±25,98	27,7±63,2	13,7±20,4
Anti-CCP IgG/IgA UI/mL Media ± DE	118,0±160,0	17,6±40,1	8,6±4,8	7,8±0,1

DAS28: Disease activity score, Art: Articulaciones, VSG: Velocidad de sedimentación globular, PCR: Proteína C reactiva, FR: Factor Reumatoide, Anti-CCP: Anticuerpos anti péptidos cíclicos citrulinados, ART: Artritis Reumatoide temprana, FPC: Familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con AR.

*Rangos de puntuación del DAS28. Menor o igual a 2.6: sin actividad, 2.6–3.2: moderado, mayor a 3.2: severa.

*Valores de referencia de PCR. Menor a 3 mg/L: negativo, 3–9 mg/L: positivo, mayor a 9 mg/L: positivo alto.

*Valores de referencia de FR: Menor a 20 UI/mL: negativo, 20–59 UI/mL: positivo, mayor a 60 UI/mL: positivo alto.

*Valores de referencia de VSG. Menor o igual a 20 mm/h: negativo, mayor a 20 mm/h: positivo.

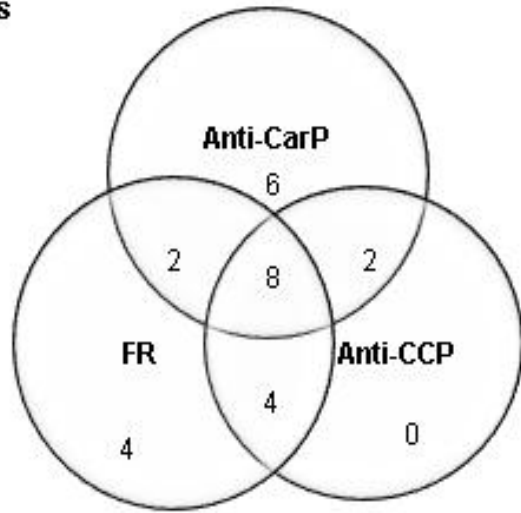
*Valores de referencia de Anti-CCP IgG/IgA. Menor a 20 UI/mL: negativo, 20–39 UI/mL: positivo débil, 40–59 UI/mL: positivo moderado, mayor a 60 UI/mL: positivo alto.

Títulos de anticuerpos anti- <i>FibHomo</i>	ART	Controles ART	FPC	Controles FPC
	n:30 (100%)	n:30 (100%)	n:30 (100%)	n:30 (100%)
≥ 1/50	18 (60,0)	5 (16,7)	12 (30,0)	3 (10,0)
≥ 1/100	14 (46,7)	1 (3,3)	12 (30,0)	0 (0,0)

ART: Artritis Reumatoide temprana, FPC: Familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con AR.

Presencia **simultánea** de biomarcadores reumatológicos en el grupo **ARt**

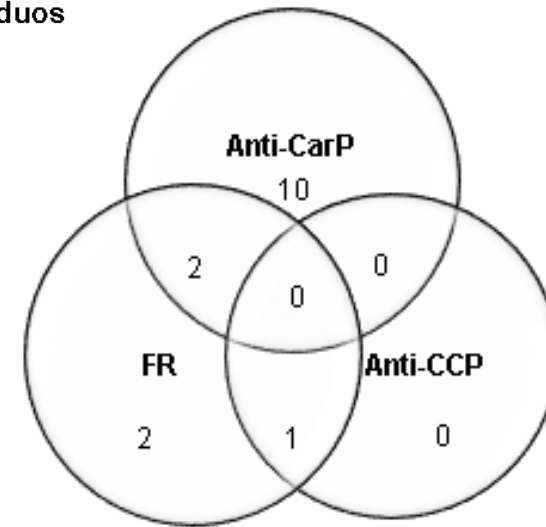
No. total de pacientes
30



Triple negativo
4

Presencia **simultánea** de biomarcadores reumatológicos en el grupo **FPC**

No. total de individuos
30



Triple negativo
15

Objetivo específico 3:

- Comparar los niveles de autoanticuerpos anti-CCP y anti-CarP en los pacientes con Artritis Reumatoide temprana (**ART**) y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con Artritis Reumatoide (**FPC**).

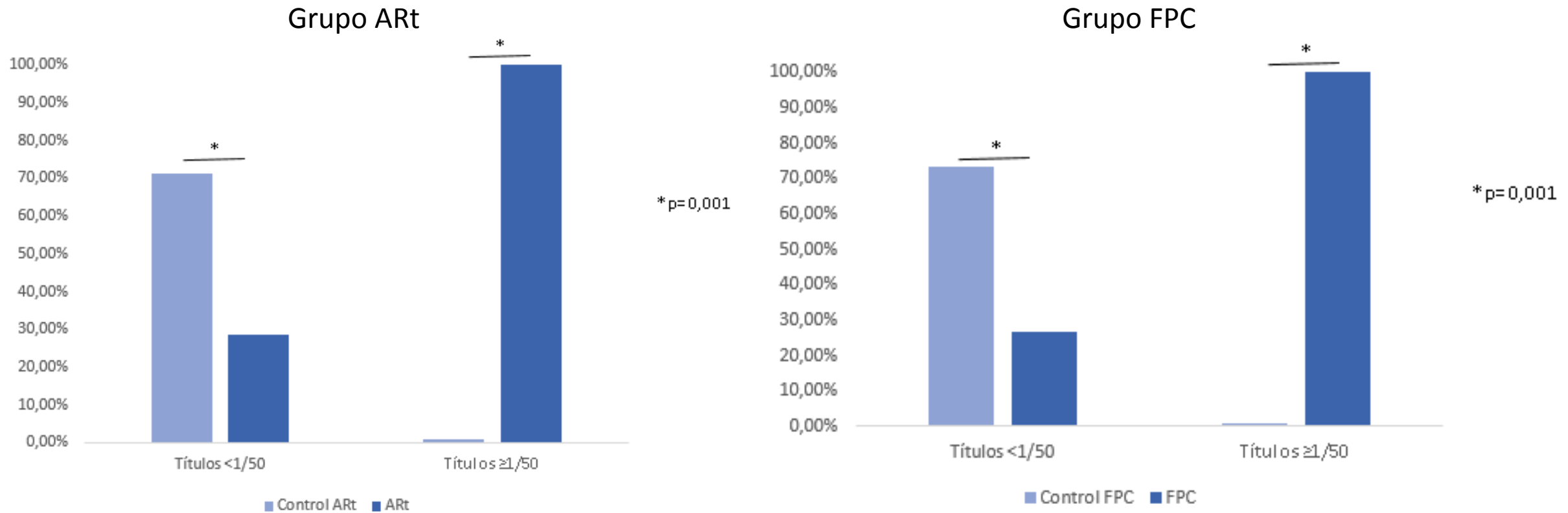
Grupo ART

Variable	Control		ART		Valor p	
	Recuento	%	Recuento	%		
VGS	Negativo	23	56,1%	18	43,9%	0,165
	Positivo	7	36,8%	12	63,2%	
PCR	Negativo	17	60,7%	11	39,3%	0,055
	3-9 mg/L	11	52,4%	10	47,6%	
FR	>9 mg/L	2	18,2%	9	81,8%	0,001*
	Negativo	27	69,3%	12	30,7%	
	20-59	2	14,3%	12	85,7%	
Anti-CCP IgG/IgA	>59	1	14,3%	6	85,7%	0,007*
	Negativo	26	61,9%	16	38,1%	
	20-59	3	42,9%	4	57,1%	
Articulaciones Dolorosas	>59	1	9,1%	10	90,9%	0,001*
	Ninguna	22	78,6%	6	21,4%	
Articulaciones inflamadas	Al menos 1	8	25,0%	24	75,0%	0,001*
	Ninguna	26	89,6%	3	10,4%	
DAS28-VSG	Al menos 1	4	12,9%	27	87,1%	0,001*
	<2.6	18	78,3%	5	21,7%	
	2.6-3.2	5	71,4%	2	28,6%	
DAS28-PCR	>3.2	7	23,3%	23	76,7%	0,001*
	<2.6	23	88,5%	3	11,5%	
	2.6-3.2	2	28,6%	5	71,4%	
VAS	>3.2	5	18,5%	22	81,5%	0,037
	0-50	26	57,8%	19	42,2%	
	>50	4	26,7%	11	73,3%	

Grupo FPC

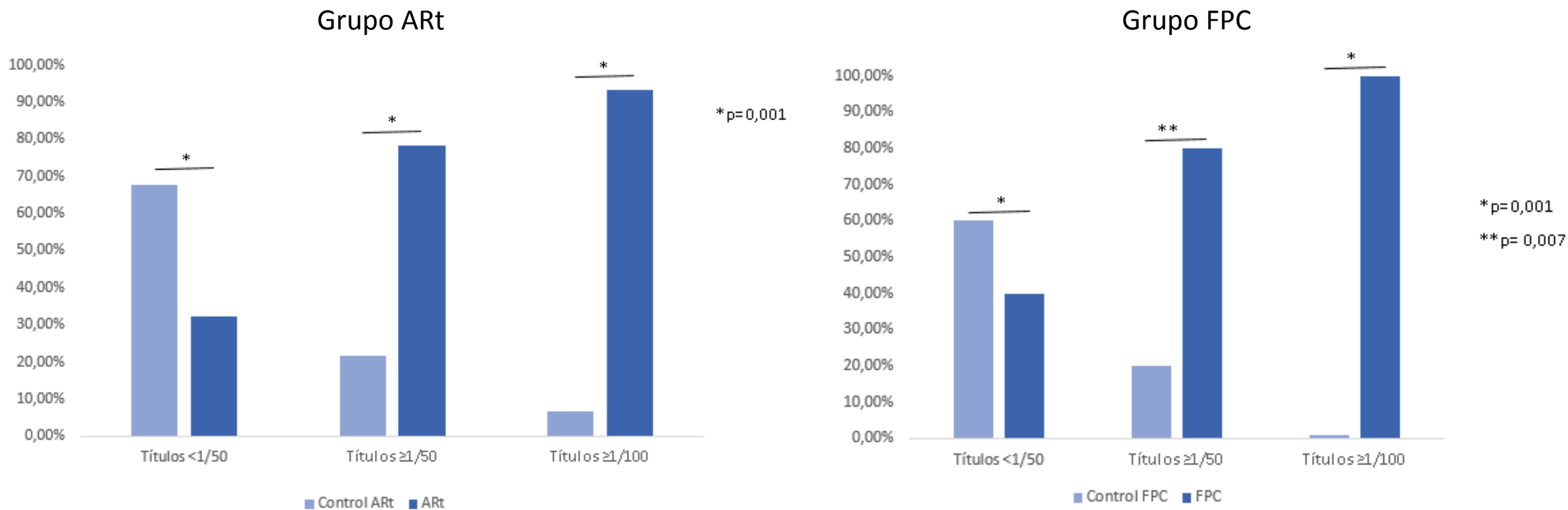
Variable	Control		FPC		Valor p	
	n	% de la fila	n	% de la fila		
VGS	Negativo	26	47,7%	29	52,7%	0,161
	Positivo	4	80,0%	1	20,0%	
PCR	Negativo	22	55,0%	18	45,0%	0,322
	3-9 mg/L	7	46,7%	8	53,3%	
	>9 mg/L	1	20,0%	4	80,0%	
FR	Negativo	29	53,7%	25	46,3%	0,192
	20-59	1	25,0%	3	75,0%	
	>59	0	0,0%	2	100,0%	
Anti-CCP IgG/IgA	Negativo	30	50,8%	29	49,2%	0,313
	Positivo	0	0,0%	1	100,0%	
Articulaciones Dolorosas	Ninguna	24	61,5%	15	38,5%	0,015*
	Al menos 1	6	28,6%	15	71,4%	
Articulaciones inflamadas	Ninguna	27	51,9%	25	48,1%	0,448
	Al menos 1	3	37,5%	5	62,5%	
HAQ	≤ 1	28	52,8%	25	47,2%	0,373
	1,1-2	1	20,0%	4	80,0%	
	>3	1	50,0%	1	50,0%	

Autoautoanticuerpos frente al péptido *FibNorm*



Auger I, et al. 2005

Autoautoanticuerpos frente al péptido *FibHomo*



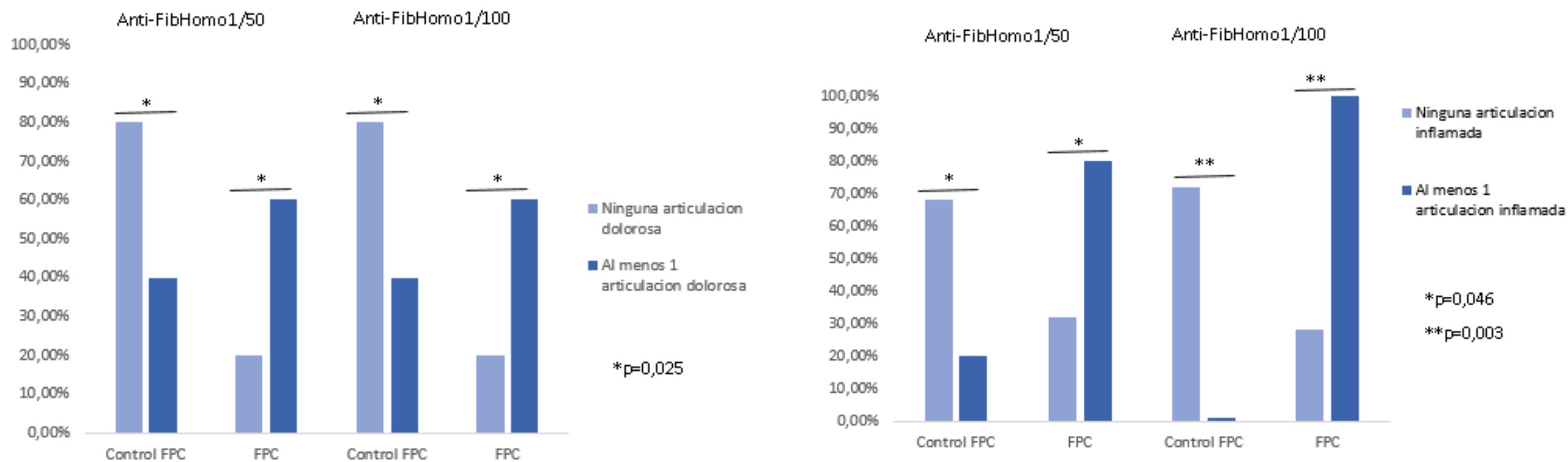
Objetivo específico 4:

- **Evaluar la asociación entre autoautoanticuerpos anti-CarP con la actividad reumática en pacientes con Artritis Reumatoide temprana (ARt) y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con Artritis Reumatoide (FPC).**

Grupo ARt

Variables reumatológicas		Anticuerpos anti- <i>FibHomo</i> 1/50				Valor p	Variables reumatológicas		Anticuerpos anti- <i>FibHomo</i> 1/100				Valor p
		Negativo		Positivo					Negativo		Positivo		
		n	% de la fila	n	% de la fila			n	% de la fila	n	% de la fila		
VSG	Negativo	8	44,4%	10	55,6%	0,543	VSG	Negativo	12	66,7%	6	33,3%	0,073
	Positivo	4	33,3%	8	66,7%			Positivo	4	33,3%	8	66,7%	
PCR	Negativo	4	36,4%	7	63,6%	0,725	PCR	Negativo	7	63,6%	4	36,4%	0,351
	3-9 mg/L	5	50,0%	5	50,0%			3-9 mg/L	6	60,0%	4	40,0%	
	>9 mg/L	3	33,3%	6	66,7%			>9 mg/L	3	33,3%	6	66,7%	
FR	Negativo	4	33,3%	8	66,7%	0,784	FR	Negativo	5	41,7%	7	58,3%	0,547
	20-59	5	41,7%	7	58,3%			20-59	7	58,3%	5	41,7%	
	>59	3	50,0%	3	50,0%			>59	4	66,7%	2	33,3%	
Anti-CCP IgG/IgA	Negativo	8	50,0%	8	50,0%	0,232	Anti-CCP IgG/IgA	Negativo	9	56,3%	7	43,8%	0,732
	Positivo	4	28,6%	10	71,4%			Positivo	7	50,0%	7	50,0%	
Articulaciones Dolorosas	Ninguna	2	33,3%	4	66,7%	0,709	Articulaciones Dolorosas	Ninguna	4	66,7%	2	33,3%	0,464
	Al menos 1 o mas	10	41,7%	14	58,3%			Al menos 1	12	50,0%	12	50,0%	
Articulaciones inflamadas	Ninguna	2	66,7%	1	33,3%	0,320	Articulaciones inflamadas	Ninguna	2	66,7%	1	33,3%	0,626
	Al menos 1 o mas	10	37,0%	17	63,0%			Al menos 1	14	51,9%	13	48,1%	
DAS28 VSG	Menor a 2,6	2	40,0%	3	60,0%	0,956	DAS28 VSG	Menor a 2,6	3	60,0%	2	40,0%	0,946
	Entre 2,6 – 3,2	1	50,0%	1	50,0%			Entre 2,6 – 3,2	1	50,0%	1	50,0%	
	Mayor a 3,2	9	39,1%	14	60,9%			Mayor a 3,2	12	52,2%	11	47,8%	
DAS28 PCR	Menor a 2,6	1	33,3%	2	66,7%	0,969	DAS28 PCR	Menor a 2,6	2	66,7%	1	33,3%	0,818
	Entre 2,6 – 3,2	2	40,0%	3	60,0%			Entre 2,6 – 3,2	3	60,0%	2	40,0%	
	Mayor a 3,2	9	40,9%	13	59,1%			Mayor a 3,2	11	50,0%	11	50,0%	
RAPID 3	Severidad Alta	5	31,3%	11	68,8%	0,084	RAPID 3	Severidad Alta	5	31,3%	11	68,8%	0,084
	Severidad Moderado	6	75,0%	2	25,0%			Severidad Moderado	6	75,0%	2	25,0%	
	Severidad Baja	0	0,0%	3	100,0%			Severidad Baja	0	0,0%	3	100,0%	
	Remisión	1	33,3%	2	66,7%			Remisión	1	33,3%	2	66,7%	

Grupo FPC



Alessandri C, et al. 2015.
Koppejan H, et al. 2016.

Objetivo específico 5:

- **Evaluar la asociación entre autoanticuerpos anti-CarP con variables periodontales en pacientes con Artritis Reumatoide temprana (ARt) y familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con Artritis Reumatoide (FPC).**

Grupo ARt

Variables periodontales	Anticuerpos anti- <i>FibHomo</i> 1/100					Valor p
	Negativo		Positivo			
	n	% de la fila	n	% de la fila		
DX Periodontal	Ausencia	5	50,0%	5	50,0%	0,796
	Presencia	11	55,0%	9	45,0%	
Severidad	Ninguna	5	50,0%	5	50,0%	0,862
	Leve	1	33,3%	2	66,7%	
	Moderada	6	60,0%	4	40,0%	
	Severidad	4	57,1%	3	42,9%	
<i>P. gingivalis</i> (F)	Ausencia	5	62,5%	3	37,5%	0,544
	Presencia	11	50,0%	11	50,0%	
Anticuerpos IgG1 contra <i>P. gingivalis</i>	<1/100	11	61,1%	7	38,9%	0,296
	>1/100	5	41,7%	7	58,3%	
Anticuerpos IgG2 contra <i>P. gingivalis</i>	<1/100	14	63,6%	8	36,4%	0,061
	>1/100	2	25,0%	6	75,0%	

P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*
*p < 0,05: diferencia estadísticamente significativa

Grupo FPC

Variables periodontales	Anticuerpos anti- <i>FibHomo</i> en títulos 1/100					Valor p
	Negativo		Positivo			
	n	% de la fila	n	% de la fila		
Diagnostico Periodontal	Ausencia	10	71,43%	4	28,57%	0,232
	Presencia	8	50,00%	8	50,00%	
Severidad	Ninguna	10	71,43%	4	28,57%	0,043*
	Leve	5	83,33%	1	16,67%	
	Moderada	2	22,22%	7	77,78%	
	Severa	1	100,00%	0	0,00%	

*p < 0,05: diferencia estadísticamente significativa

Freire MO, Van Dyke TE. 2000.
Bright R, et al. 2017.

CONCLUSIONES

- Se establece la presencia de autoanticuerpos frente a péptidos carbamilados en la población de familiares en primer grado de consanguinidad colombiana estudiada, asociándolos con variables clínicas de compromiso articular así como a un estado periodontal más severo.
- Adicionalmente se observó que tanto los pacientes con artritis reumatoide temprana como familiares en primer grado de consanguinidad presentaron autoanticuerpos frente al péptido nativo de fibrinógeno, fenómeno que podría explicar las fases iniciales en la patogénesis de la enfermedad.
- No se establecieron asociaciones entre autoanticuerpos frente a péptidos carbamilados en los pacientes con artritis reumatoide temprana posiblemente por tamaño muestra.

Logros

- Estandarización de la técnica
- Aporte a la comunidad científica

Limitaciones

- Número de sujetos en el grupo de estudio

Perspectivas

- Realizar estudios longitudinales para confirmar o contrastar lo observado
- Aumentar el tamaño de muestra

GRACIAS

