

actualización

¿Cuál es el verdadero rol de los ACPAs en la artritis reumatoidea?

Rodrigo García Salinas¹, Gustavo Citera², Sebastián Juan Magri^{1,3}

¹ Esp. Reumatología, Hospital Italiano de La Plata.

² Instituto de Rehabilitación Psicosfísica, Ciudad de Buenos Aires.

³ Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas UNLP.

R E S U M E N

Palabras clave:
ACPA, artritis reumatoidea.

Hasta hace algunos años, se consideraban a los ACPAs como el resultado de un epifenómeno de la respuesta inmune en la AR, su detección se centraba en el diagnóstico y clasificación de los pacientes. Recientemente se ha comenzado a demostrar fehacientemente que los ACPAs cumplen un rol central en la fisiopatología de la AR. En esta revisión, exponemos de forma exhaustiva la relación de estos anticuerpos con los factores genéticos ambientales, su interrelación con la función de células T y su participación en la diferenciación de osteoclastos, puntualizando en su dinámica de concentración, isotipos y modificaciones momentos antes del desarrollo de la AR. También hacemos hincapié en otros procesos de modificación de proteínas que se presentan en la AR, como por ejemplo la carbamilación. Por último, resaltamos las implicancias terapéuticas que podrían tener la seropositividad y la seroconversión de estos anticuerpos.

A B S T R A C T

Key words:
ACPA, rheumatoid arthritis.

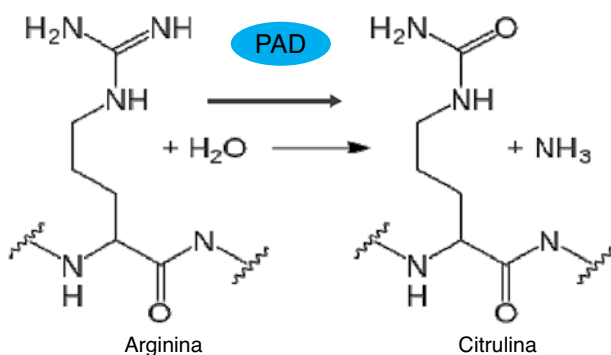
Until some years ago, ACPAs were considered as the result of an epiphenomenon of the immune response in RA, its detection focused on the diagnosis and classification of patients. It has recently been established that ACPAs play a central role in the pathophysiology of RA. In this review, we present an exhaustive list of these antibodies with environmental genetic factors, their interrelationship with T cell function and their participation in osteoclast differentiation, emphasizing their concentration dynamics, isotypes and modifications just before the development of the AR. We also emphasize other protein modification processes that occur in RA, such as carbamylation. Finally, we highlight the therapeutic implications that seropositivity and seroconversion of these antibodies could have.

La citrulinización como proceso biológico, los ACPAs como método diagnóstico

La citrulinización de proteínas es un proceso natural, en el cual el aminoácido arginina es convertido a citrulina mediante la enzima peptidil-arginina-deaminasa (PAD), de la cual se conocen 5 isotipos: 1, 2, 3, 4 y 6. Este proceso significa una modificación muy pequeña en la masa de la proteína (menos de 1 Dalton); sin embargo, la clave del proceso es la pérdida de una carga positiva del grupo amino volviendo así neutra a la citrulina^{1,2}. Esto produce cambios conformacionales en la estructura cuaternaria de la proteína y modifica la habilidad de esta proteína para interactuar con las proteínas vecinas.

El desarrollo de anticuerpos contra varios péptidos citrulinados, se ha utilizado como uno de los más importantes biomarcadores de AR, los anticuerpos antiproteínas citrulinadas, o por sus siglas en inglés ACPAs.

Figura 1. Proceso de transformación a citrulina.



Si bien, en un principio, se detectaron múltiples anticuerpos contra la queratina del estrato córneo de ratones con AR (AKA), secundariamente se conoció que la proteína antigénica era la filagrina. En el proceso de transformación de profilagrina a filagrina, los residuos de arginina son transformados a citrulina y éste es el verdadero antígeno hacia el cual están dirigidos los anticuerpos. Existen otros anticuerpos específicos de AR como los dirigidos contra la glucosa 6 fosfato isomerasa, que mostraban una altísima especificidad (mayor al 95%), cercana a la de los antipeptidos citrulinados (ACCP) de primera generación, la razón se debía a que estos anticuerpos reconocían, no a la proteína en sí, sino a los residuos citrulinados. Es por ello que a esta familia de anticuerpos que reconoce múltiples epítopes se las conoce en forma conjunta como ACPAs. Actualmente sabemos que los ACPAs

Figura 2. Diferentes isotipos de ACPA reconocidos por el Test de anti-CCP.

Filaggrin 48-65
Fibrinogen B 246-267
Fibrinogen
Fibrinogen A 211-230
Fibrinogen A 582-599
Fibrinogen A 556-575
Fibrinogen A 616-635
Vimentin
H2B/a 62-81
H2A/a 1-20
Histones 2A
Histones 2B
Clusterin 221-240
Clusterin 231-250
Biglycan 247-266
Enolase 1A 5-21
Vimentin 58-77
Apolipoprotein E
Apolipoprotein E 277-296

Anti-CCP

pueden unir residuos citrulinados presentes en varias proteínas presentes en el cuerpo humano incluyendo la vimentina, alfa-enolasa, fibronectina, fibrinógeno, histonas y colágeno tipo II³.

La detección de ACPAs en sangre es uno de los test más importantes para la clasificación de pacientes con AR y AR temprana, el más utilizado es el anti-CCP (anti-CCP). Este utiliza un péptido cíclico sintético, citrulinado con una conformación tal que es reconocido por casi todos los ACPAs, lo cual aumenta su sensibilidad. Es importante, en este apartado, hacer énfasis que anti-CCP no es lo mismo que ACPA, el anti-CCP es un test de screening que reconoce varios ACPAs; su sensibilidad es del 75% y su especificidad del 97%. Existen otros métodos menos utilizados para detectar ACPAs, el anti-Sa y el antivimentina citrulinada mutada, con una sensibilidad del 43% y 75%, respectivamente, y especificidad que supera el 95%⁴.

¿Es lo mismo la AR ACPA positiva que ACPA negativa?

Es importante comprender que la positividad para los ACPAs tiene su sustento en factores genéticos, ya que se conoce que los pacientes con ACPA positivo presentan mayor frecuencia de alelos del HLA-DR4 y polimorfismos del PPTN22. Citera y cols. pudieron demostrar, en un grupo de pacientes con AR de Argentina, que la presencia del HLA-DR4 y el PPTN22 aumenta por dos las chances de tener AR con respecto a individuos que no portan estos^{5,6,7}.

Por otro lado, no hay que dejar de tener en cuenta que en la AR ACPA positiva, el medio ambiente juega un papel preponderante. Existe una diferencia importante entre la severidad de la AR entre pacientes fumadores y no fumadores, siendo más frecuente encontrar seropositividad para ACPA en los primeros⁸. La enfermedad periodontal con presencia de *porfirromona gingivalis* (bacteria portadora de PAD) es otro factor para el desarrollo de AR ACPA positiva^{9,10}.

Es conocido, que la presencia de autoanticuerpos está asociada con síntomas más severos, mayor daño estructural y aumento de la mortalidad^{11,12}. ACPA y FR son considerados cruciales en las matrices de riesgos desarrolladas en el estudio Best para predecir rápida progresión radiológica, junto con la proteína C reactiva (PCR)¹³. Seegobin y colaboradores, en el estudio CARDERA, demostraron en pacientes con AR temprana, que quienes presentaban ACPA positivo requerían esquemas de DMARs combinados y más intensivos, además de presentar mayor progresión radiológica que los pacientes ACPA negativos^{13,14}.

Poder lograr la remisión libre de drogas es uno de los objetivos más preciados en el tratamiento de la AR; varios estudios han demostrado que la positividad para ACPA es un factor independiente negativo para lograr este objetivo (HR: 0,09 p:0,001)¹⁵. A su vez, la posibilidad de suspender o disminuir la dosis del tratamiento biológico es una de las estrategias cada vez más utilizadas para optimizar el tratamiento; el equipo del Hospital Italiano de La Plata observó, en un grupo de pacientes con AR, que la positividad para ACPA era un factor contrario para suspender o disminuir la dosis de agentes biológicos¹⁶.

También existen diferencias histológicas en el análisis de biopsias de sinovial; los pacientes positivos presentaban un menor espesor sinovial, lo que correspondería a una sinovial menos fibrótica, pero sobre todo un aumento marcado de la cantidad de linfocitos. Asimismo se encontraron diferencias en la proporción de diferentes poblaciones linfocitarias entre ellas CD3, CD8¹⁷.

Es también conocido que el paciente seropositivo responde mejor a ciertas terapias, como por ejemplo las dirigidas a poblaciones B o T¹⁸. Es por esto que creemos conveniente comenzar a marcar una diferencia importante en aquellos pacientes ACPA positivos de los negativos, y creemos que se tratan de dos enfermedades totalmente diferentes.

El rol patogénico de los ACPAs

La primera observación acerca de este fenómeno fue que los

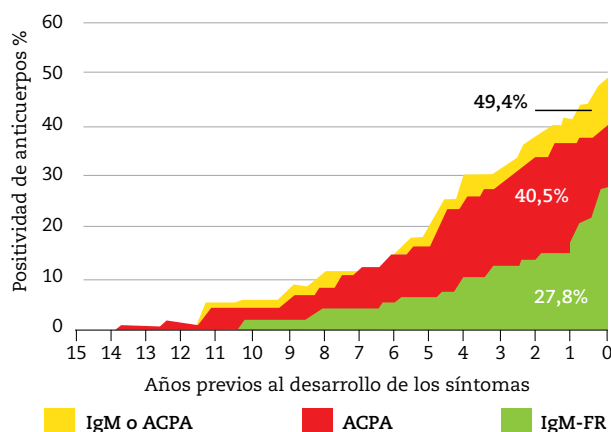
inmunocomplejos conformados por el ACPA y sus antígenos ricos en citrulina y la subsecuente unión del Factor Reumatoideo (FR) llevaba a una activación abundante del complemento^{19,20,21}. Pero el mayor avance fue la detección de respuesta autoinmune celular desencadenada por las proteínas citrulinadas^{22,23}.

Uno de los procesos iniciales de la cascada de eventos inmunológicos es la presencia de citrulina en las histonas H3, que al neutralizar su carga positiva permite la descondensación de la cromatina; este evento, en los neutrófilos, produce una muerte celular muy característica llamada netosis. El término proviene de NETs (*neutrophil extracellular traps*), los neutrófilos son una de las primeras barreras de defensa frente a infecciones y liberan estos NETs como una manera de intentar neutralizarlas. Estos NETs están formados por cromatina descondensada y fuertemente citrulinada. Aparece en un contexto en el cual el sistema inmune está activado y podría ser el gatillo para la generación de un proceso autoinmunitario^{24,25}.

Se desconoce en qué tejido se activa este primer evento inmune, pero el pulmón es un candidato más que atractivo; debido a la evidencia de que el tabaco es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar AR, la presencia de péptidos citrulinados compartidos (idénticos) tanto en pulmón como en sinovial detectados por biopsias apoyan fuertemente esta teoría²⁶. Adicionalmente, la presencia de grandes concentraciones de PAD 2 y 4, y una alta intensidad de citrulinización en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (versus pacientes sanos), dejan de manifiesto el papel de este órgano en el inicio de la AR²⁷.

Los ACPAs pueden ser detectados en sangre, hasta 10 años antes del desarrollo clínico de la AR²⁸. Durante este tiempo la concentración de ACPAs va paulatinamente en aumento, acompañada por un incremento directamente proporcional de la concentración de citoquinas en suero; este fenómeno alcanza su nivel más alto momentos antes del inicio del compromiso articular²⁹.

Figura 3. Desarrollo de ACPA y FR previo al inicio de la AR.



En este período previo al desarrollo clínico de la AR, la especificidad de los ACPAs por distintos antígenos aumenta, desarrollando un fenómeno conocido como "spreading", donde se ha reconocido mayor especificidad a proteínas como apolipoproteína E, fibrinógeno, entre otras. A su vez, simultáneamente, aumentan los isotipos de ACPA, pudiéndose encontrar ACPA IgG, IgA en forma de dímeros, IgM en pentámeros e IgE asociados a mastocitos^{30,31,32,33}. La presencia de estos diferentes isotipos de ACPA se asocian a un mayor daño radiológico, esto fue demostrado por van der Woude y cols. en el estudio de dos cohortes (Países Bajos y Noruega) con un seguimiento de 4 y 10 años³⁴.

La activación de la respuesta inmune produce inicialmente una respuesta de anticuerpos IgM (respuesta aguda), seguida un tiempo después por una respuesta IgG (respuesta de memoria)³⁵. En la AR se ha observado que los ACPA IgM persisten en circulación en forma constante hasta 7 años desde iniciado los síntomas, lo que habla de una activación constante de la

respuesta autoinmune de forma autopropetuada³⁶.

La glicosilación de las Inmunoglobulinas tiene un importante impacto en su función biológica; tal es así que el status de glicosilación de los ACPAs va cambiando con el correr del tiempo, confiriéndole mayor estabilidad a la unión de estos con sus antígenos y aumentando sus propiedades proinflamatorias. Este proceso le confiere a los ACPAs características fenotípicas específicas, por ejemplo, los ACPA IgG de los pacientes que desarrollan AR presentan una reducción de la galactosilación y un aumento de la fucosilación, siendo esto progresivo hasta el inicio de los síntomas^{37,38,39}.

Los ACPAs pueden formar complejos inmunitarios que interactúan con el FR, potenciando así el efecto sobre la respuesta inflamatoria y destructiva^{40,41}. Los pacientes con epítipo compartido positivo tienen mayor capacidad para reconocer ACPA, ya que en el pocket 4 que está cargado positivamente, tiene mayor capacidad de unir citrulina neutra que otro aminoácido con carga positiva, facilitando así el reconocimiento antigénico^{10,42,43}. Usando tetrameros HLA-DRB1 * 0401, se han encontrado células T-helper-1 específicas de citrulina en la circulación de pacientes con AR, particularmente en aquellos con enfermedad temprana, aunque su contribución a mecanismos autoinmunes permanece incierta. Las biopsias de ganglios linfáticos en la artritis reumatoidea temprana sugieren la activación de células T distante de la sinovial^{44,45}.

Los ACPAs por sí mismo pueden desencadenar la inflamación articular solamente si existe algún daño previo en la articulación, pero no en la articulación intacta. Khun y cols. demostraron que inyectando ACPA en articulaciones sanas de ratones, no se producía artritis; sin embargo, si estos eran sensibilizados con colágeno tipo II, los ratones sí desarrollaban artritis⁴⁶. Los ACPAs tienen la capacidad de activar en forma directa macrófagos, por ejemplo, uniéndose directamente a receptores tipo Toll o Fc, y de la misma forma activan osteoclastos a través de complejos inmunes que se acoplan a receptores Fc, promoviendo la pérdida ósea. Esto se observó especialmente en cultivos de osteoclastos que fueron enfrentados a sueros ACPA positivo, donde se observó que la resorción ósea se incrementaba en forma directa a la concentración de ACPAs; a su vez se observó un incremento de factor de necrosis tumoral alfa y RANKL⁴⁷. Esta activación de la osteoclastogénesis mediada por los ACPAs se comprobó también evaluando el volumen de hueso y la alteración trabecular, por tomografía de alta resolución de radio ultradistal, en pacientes con AR ACPA positivo versus negativos, observándose una disminución marcada de los primeros con respecto a los negativos⁴⁸. Lo interesante de este proceso, es que cuando se analizó la estructura ósea en personas ACPA positivos y negativos, pero sin evidencia de artritis, la masa ósea trabecular estaba disminuida en los primeros y se observó además fenestración de la cortical, a través de la cual podrían filtrarse más complejos inmunes⁴⁹.

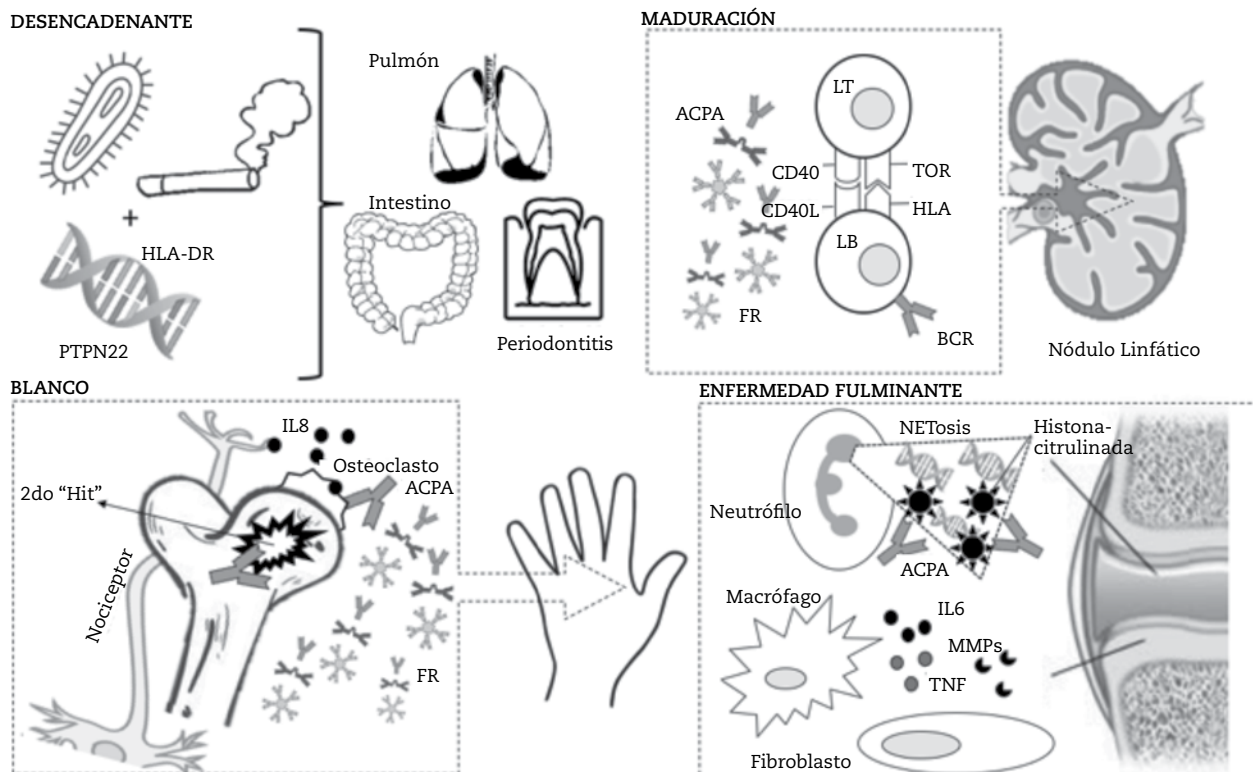
Actualmente se postula que esta pérdida de hueso mediada por ACPA se relaciona a una quemoquina conocida como CXCL 8 o IL8; esta IL favorece la activación de los osteoclastos y atrae neutrófilos (NETs) a la articulación; a su vez estaría implicada en las artralgiás que el paciente experimenta antes de la inflamación clínica, ya que se han detectado receptores para IL8 en las terminales nociocéptivas de la articulación^{50,51,52}.

La participación osteoclastica, la IL 8 y los procesos dependientes de LT, que se dan previos al desarrollo clínico de la AR, han puesto en jaque la creencia de que el proceso autoinmune articular comienza en la sinovial, para luego continuar con el daño óseo (Outside-In). Con los hallazgos que mencionamos, otros autores proponen que sería más que razonable pensar que éste es un proceso que se inicia en el hueso para luego ir progresando al resto de la articulación (Inside-Out)⁵³.

Más allá de la citrulinización

Se ha puesto mayor interés en otros procesos de modificación proteica, distintos a la citrulinización, entre ellos los más destacados son la carbamilación y la acetilación. La carbamilación es un proceso no enzimático, donde el aminoácido lisina es

Figura 4. Desde los factores desencadenantes hasta el desarrollo de la AR.



transformado a homocitrulina, y la acetilación conlleva a la formación de lisina acetilada. Se han detectados anticuerpos antiproteína carbamiladas en suero de pacientes con AR, entre 4 y 6 años previos al desarrollo de la enfermedad^{54,55}. Los anticuerpos antivimentina acetilada podrían ser útiles para identificar pacientes con artritis inflamatorias. La acetilación de proteínas citoplasmáticas puede modificar o regular procesos enzimáticos y vías metabólicas en la célula, y es una de las maneras en que la microbiota puede interferir en las funciones del huésped⁵⁶. Se estudió la relación de los anticuerpos antiproteínas carbamiladas y los factores de riesgo genéticos y ambientales, en dos cohortes de pacientes con AR temprana (Leiden y Suecia), y no se encontró relación entre la positividad de estos anticuerpos, la presencia de alelos de HLA-DRB1, PTPN22 y el tabaco. Sin embargo, se pudo observar positividad en estos anticuerpos en pacientes ACPA negativos, sugiriendo que los mecanismos biológicos que llevan a la carbamitación son diferentes a los de la citrulinización^{57,58}.

Toda esta multiplicidad antigénica y su consiguiente formación de anticuerpos le han valido a la AR la merecida analogía de “camaleón antigénico”, según propuso Feist en un brillante editorial⁵⁹.

¿Tiene el tratamiento algún impacto sobre los ACPA o viceversa?

Sokolove y cols., en un subanálisis del estudio AMPLE (abatacept vs. adalimumab), mostraron que, en ambas ramas, la respuesta al tratamiento era mejor en aquellos pacientes Anti-CCP positivos en el basal (medido por DAS28). La media de cambio (mejoría) del DAS28 era superior en los pacientes ACPA positivos con mayores títulos (cuartilo 4), sobre todo en los pacientes de la rama abatacept; lo mismo se observa en la media de cambio de HAQ desde el basal. Los títulos de ACPA contra Apolipoproteína E e Histonas 2A y 2B se redujeron durante el seguimiento a dos años, observándose una tendencia de reducción mayor en la rama de abatacept^{60,61}.

En un análisis post-hoc del estudio AVERT (abatacept en AR temprana MTX naive), donde todos los pacientes reclutados eran ACPA positivo, se observó un descenso del número de epitopes reconocidos por los ACPAs; esta diferencia fue mayor en la combinación de abatacept con metotrexato, que en las ramas de monoterapia^{62,63}.

Estos datos son originados en subanálisis de ensayos clínicos y deberían ser corroborados por estudios especialmente diseñados para medir el impacto de la reducción de los títulos de ACPA en la clínica. Sin embargo, uno podría presumir que aquellas terapias que actúan directamente sobre la célula B y sobre la célula T tendrían una efectividad superior a otras terapias en sujetos con ACPA positivos y especialmente en aquellos con altos títulos de los mismos con activación antigénica continua. De esta manera los ACPAs no solo serían un marcador específico de diagnóstico y de severidad, sino que la determinación de sus títulos podría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas⁶⁴.

Conclusiones

El descubrimiento de los ACPAs ha significado un avance muy importante no solo para el diagnóstico y clasificación de los pacientes con AR, sino para entender de una manera acabada la fisiopatología de la enfermedad y los eventos desencadenantes inmediatos a la misma. Por otra parte, profundizar el conocimiento en esta área podría tener importantes implicancias terapéuticas en un futuro no lejano, ya que por ejemplo y en un intento presuntuoso por prevenir el desarrollo de la enfermedad en aquellas personas ACPA positivas y con un background genético predisponente, no solo deberíamos evitar el consumo de tabaco, sino eventualmente utilizar inhibidores de la PAD que limiten la formación de ACPAs y consecuentemente la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad. Probablemente lo que conocemos de la patogenia de la AR es sólo la punta del iceberg, pero esto nos ha permitido desarrollar varias terapias que hoy ayudan a nuestros pacientes con AR. Es nuestra misión y nuestro

deseo intensificar la investigación en este campo con el objeto de mejorar esos logros por el bien de nuestros pacientes con Artritis Reumatoidea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Witalison E, Thompson P, Lorne H: Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation Curr Drug Targets. Author manuscript; available in PMC 2016 Jan 1.
2. van Venrooij WJ, Pruijn GJ: Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(4):249-51.
3. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al: Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2007 Jun 5;146(11):797-808.
4. Taylor P, Gartemann J, Hsieh J, Creeden J: A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated Peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. *Autoimmune Dis.* 2011;2011:815038.
5. Cerna M, Falco M, Friedman H, et al: Differences in HLA class II alleles of isolated South America Indian populations from Brazil and Argentina. *Human Immunol* 1993;37:213-20.
6. Citera G, Padulo LA, Fernández G, Lázaro MA, Rosemffet M, Maldonado Cocco JA: Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: Susceptibility and severity in Argentine patients. *J Rheumatol* 2001;28:1486-91.
7. Dal Pra F, Citera G, Landi M, Waimann C, et al: Frecuencia de antígenos leucocitarios humanos en región DR en pacientes con artritis temprana en Argentina. Evaluación de su utilidad como herramienta complementaria para discriminar pacientes con artritis indiferenciada y artritis reumatoidea. *Rev Arg de Reum*, 2014.
8. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L & Klareskog L: A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3085-3092.
9. Mikuls TR et al. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int. Immunopharmacol.* 20009;9:38-42.
10. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L: The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017 Jan;17(1):60-75.
11. Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, et al. Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *J Rheumatol* 2008;35:1009-14.
12. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2113-21.
13. Visser K, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Roodman HK, Seys PE, Kerstens PJ, et al: A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jul;69(7):1333-7.
- 13bis. Visser K, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Roodman HK, Seys PE, Kerstens PJ, et al: A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jul;69(7):1333-7.
14. Seegobin SD, Ma MH, Dahanayake C, Cope AP, Scott DL, Lewis CM, et al: ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination DMARDs and corticosteroids: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jan 16;16(1):R13.
15. van der Woude D, Young A, Jayakumar K, Mertens BJ, Toes RE, van der Heijde D, et al: Prevalence of and predictive factors for sustained disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: results from two large early arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2262-71.
16. Girard Bosch MP, Garcia Salinas RN, Martire MV, Arturi P, Magri SJ, et al: Optimizing biologic therapy in rheumatology: frequency and characteristics from argentine referral centre. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2016;11(6):108-112.
17. van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM: Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):53-60.
18. Cohen MD, Keystone E: Rituximab for Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol Ther.* 2015 Dec;2(2):99-111.
19. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R94.
20. Sabharwal UK, Vaughan JH, Fong S, Bennett PH, Carson DA, Curd JG. Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4. *Arthritis Rheum* 1982;25:161-67.
21. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol* 2015;194:3664-74.
22. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101:273-81.
23. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)flaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999;162:585-94.
24. Mohanan S, Cherrington BD, Horibata S, McElwee JL, Thompson PR, Coonrod SA: Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int.* 2012;2012:895343. Epub 2012 Sep 16.
25. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al: Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014 May;20(5):511-7.
26. Reynisdottir G, Olsen H, Joshua V, et al. Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015.
27. Lugli EB, Correia RE, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, et al: Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015 Jan 20;17:9.
28. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink WH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004;50:380-86.
29. van Steenberg HW, Aletaha D, Beart-van de Voorde LJ, Brouwer E, Codreanu C, Combe B, et al: EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Mar;76(3):491-496.
30. Rombouts Y, Willemze A, van Beers JJ, et al. Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:578-85.
31. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, et al. Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:234-41.

32. Kerkman PF, Fabre E, van der Voort EI, et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015; published online June 1. DOI:10.1136/annrheumdis-2014-207182.
33. Nimmerjahn F1, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34-47.
34. van der Woude D, Syversen SW, van der Voort EI, Verpoort KN, Goll GL, van der Linden MP, et al: The ACPA isotype profile reflects long-term radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):1110-6.
35. Garcia Salinas R: Inmunología aplicada a la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes. En: Diagnóstico en reumatología y enfermedades autoinmunes sistémicas. De Arturi AS, Editor: Abbvie S.A. 1ra Edición: 2014
36. Verpoort KN, Jol-van der Zijde CM, Papendrecht-van der Voort EA, Ioan-Facsinay A, Drijfhout JW, van Tol MJ, et al: Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3799-808.
37. Rombouts Y, Willemze A, van Beers JJ, et al. Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:578-85.
38. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, Selman MH, Trouw LA, Deelder AM, et al: Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jan;74(1):234-41.
39. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA: The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:21-50.
40. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther* 2015;17:229.
41. Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:813-21.
42. Klarenbeek PL, de Hair MJ, Doorenspleet ME, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1088-93.
43. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):538-41.
44. James EA, Rieck M, Pieper J, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1712-22.
45. de Hair MJ, Zijlstra IA, Boumans MJ, et al. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1911-12.
46. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH: Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):961-73.
47. Harre U, Georgess D, Bang H, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012;122:1791-802.
48. Kocijan R, Finzel S, Engbrecht M, Engelke K, Rech J, Schett G. Differences in bone structure between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients relative to autoantibody positivity. *Ann Rheum Dis*. 2014 Nov;73(11):2022-8.
49. Kleyer A, Finzel S, Rech J, Manger B, Krieter M, Faustini F, et al: Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014 May;73(5):854-60.
50. Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, et al: Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):721-9.
51. van de Stadt LA1, Witte BI, Bos WH, van Schaardenburg D: A prediction rule for the development of arthritis in seropositive arthralgia patients. *Ann Rheum Dis*. 2013 Dec;72(12):1920-6.
52. Wigerblad G, Bas DB, Fernades-Cerqueira C, Krishnamurthy A, Nandakumar KS, Rogoz K, et al: Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):730-8.
53. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 May;69(5):787-9.
54. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 225-30.
55. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EW, Huizinga TW, Hamann D, van Schaardenburg D et al: Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Apr;73(4):780-3.
56. Juarez M, Bang H, Hammar F, Reimer U, Dyke B, Sahbudin I, et al: Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jun;75(6):1099-107.
57. Jiang X, Trouw LA, van Wesemael TJ, Shi J, Bengtsson C, Källberg H, et al: Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1761-8.
58. Reed E, Jiang X, Kharlamova N, Ytterberg AJ, Catrina AI, Israelsson L, et al: Antibodies to carbamylated -enolase epitopes in rheumatoid arthritis also bind citrullinated epitopes and are largely indistinct from anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Res Ther*. 2016 May 4;18(1):96.
59. Feist E, Steiner G: Rheumatoid arthritis: an antigenic chameleon. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1753-4.
60. Sokolove J, Schiff M, Fleischmann R, Weinblatt ME, Connolly SE, Johnsen A, et al: Impact of baseline anti-cyclic citrullinated peptide-2 antibody concentration on efficacy outcomes following treatment with subcutaneous abatacept or adalimumab: 2-year results from the AMPLE trial. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):709-14.
61. Connolly S, Maldonado M, Schiff M, Weinblatt M, Fleischmann R, Robinson W, et al: Modulation of the ACPA Fine Specificity in Patients with RA Treated with Either Abatacept or Adalimumab in the AMPLE Study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:395.
62. Huizinga TWJ, Connolly SE, Johnsen A, Zhu J, Furst DE, Bykerk VP, et al: Effect of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide 2 Immunoglobulin M Serostatus on Efficacy Outcomes Following Treatment with Abatacept Plus Methotrexate in the Avert Trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74:234-235.
63. Huizinga TWJ, Connolly S, Johnsen A, Zhu J, Furst DE, Bykerk V: . Effect of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide 2 Immunoglobulin M Serostatus on Efficacy Outcomes Following Treatment with Abatacept Plus Methotrexate. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67 (suppl 10).
64. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun;76(6):960-977.