

Importancia clínica de los anticuerpos péptidos cíclicos citrulinados en el diagnóstico de la artritis reumatoide

Victor Arana-Argáez¹, Elda Ku-Ek¹, Jaqueline Canul-Canche¹, Ivan Chan-Zapata¹, Julio Torres-Romero²

Laboratorio de Farmacología¹, Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad²

Universidad Autónoma de Yucatán

Mérida, Yucatán, México

[victor.arana, jaqueline.canul, julio.torres]@uady.mx

Abstract—Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases, characterized by chronic inflammation of synovial joints. The American College of Rheumatology criteria for Rheumatoid Arthritis include to the Rheumatoid Factor as serological marker, however, is not specific for this disease. In recent years, in order to diagnose RA, the determination of anti-Cyclic Citrullinated Peptides was included for the diagnostic in an earlier phase, due to his potential as specific and sensitive marker, as well as the prognostic ability because may predict the eventual development into RA when found in undifferentiated arthritis. Then, the aim of this article was to review and assess the most recent scientific information about the importance of the determination of the anti-Cyclic Citrullinated Peptide for the opportune diagnosis of the Rheumatoid Arthritis and the fundamental role for the clinical laboratory in assuring the validity of this test.

Keyword—Rheumatoid Arthritis, Anti-CCP, autoantibodies, clinical diagnosis.

Resumen— La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmune más comunes, caracterizada por inflamación crónica de las articulaciones. El Colegio Americano de Reumatología incluye al Factor Reumatoide como marcador serológico para la AR, sin embargo, no es específico de la enfermedad. Recientemente, la determinación de los anti-Péptidos Cíclicos Citrulinados fue incluido como marcador para el diagnóstico de la AR en fases más tempranas, debido a su especificidad, sensibilidad y capacidad pronostica del desarrollo eventual de AR. El objetivo de este artículo fue revisar la información más reciente sobre la importancia de la determinación de los anti-Péptidos Cíclicos Citrulinados para el diagnóstico oportuno de la AR y el papel fundamental del laboratorio clínico en asegurar la validez de esta prueba.

Palabras claves— Artritis Reumatoide, Anti-CCP, autoanticuerpos, diagnóstico clínico.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas (ER) son un grupo de padecimientos que afectan el sistema musculoesquelético y tejido conectivo (músculos, tendones, ligamentos, cápsula y membrana sinovial, cartílagos y huesos). Se caracterizan por la aparición de cambios, lesiones o alteraciones en uno o varios de los elementos del aparato locomotor, además de inflamación, dolor y degeneración progresiva que puede originar incapacidad funcional. Existen una gran variedad de estos padecimientos como consecuencia de las distintas formas en las que se puede alterar al aparato locomotor; tal es el caso de la Artritis Reumatoide (AR), la cual es la artritis inflamatoria más común y donde se observa inflamación articular persistente. La AR fue clasificada en 1983 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) como una ER, ubicándola dentro de la categoría de las “Enfermedades Difusas del Tejido Conjuntivo”.

Actualmente, la disponibilidad de exámenes de laboratorio para el apoyo al diagnóstico clínico de las enfermedades reumáticas se ha incrementado gracias a los avances en el entendimiento de su inmunopatogénesis, el papel de los autoanticuerpos y el antígeno leucocitario humano (HLA) en el desarrollo y progresión de las manifestaciones clínicas, así como los cambios en la producción de citocinas. En el caso de la AR, las alteraciones inmunológicas orientan pero no diagnostican la enfermedad (sobre todo en las etapas tempranas) y, por lo general, los exámenes radiológicos no

muestran alteraciones evidentes hasta 6 meses posteriores a su establecimiento. Un diagnóstico en las primeras fases de la AR es esencial para administrar un tratamiento oportuno y agresivo con el fin de disminuir la progresión de las manifestaciones clínicas, incluso conseguir una remisión y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

En investigaciones que tenían como objetivo la búsqueda de autoanticuerpos distintos al factor reumatoide (FR) en suero de pacientes con AR, se llegó al descubrimiento de anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPC), entre los cuales se encontraron los anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP). Se ha demostrado que es necesaria la presencia de residuos de citrulina en la secuencia de péptidos de las articulaciones diartroideas de estos pacientes para que anticuerpos específicos reconozcan como extrañas a moléculas propias del organismo, desencadenando una respuesta autoinmune. Los anti-CCP secretados por LB reconocen fácilmente estos residuos y de esta manera se estableció que estos autoanticuerpos tienen un papel muy importante en el desarrollo de la AR, dando origen a la “era de los anticuerpos anti-CCP”.

Los anti-CCP pueden ser detectados en etapas tempranas de la enfermedad, incluso hasta 3 años antes de observarse los signos clínicos característicos, lo cual los convierte en un excelente marcador de diagnóstico temprano, al igual que un marcador pronóstico de enfermedad activa y erosiva, así como daño radiológico y capacidad funcional. Además permiten el diagnóstico diferencial entre AR y otras enfermedades reumáticas. Incluso, las pruebas enfocadas a detectar los anti-CCP han demostrado tener una mejor especificidad para el diagnóstico de los pacientes con AR, en comparación con el factor reumatoide (FR), resaltando la importancia de los anti-CCP en el diagnóstico de esta patología autoinmune. Se han desarrollado diversas pruebas para la determinación de anti-CCP, principalmente mediante técnicas como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), de las cuales se cuenta en la actualidad con pruebas de segunda y tercera generación con mayor sensibilidad y especificidad.

II. ARTRITIS REUMATOIDE

La AR se define como una enfermedad autoinmune, sistémica, poliarticular e inflamatoria crónica de etiología multifactorial; es el resultado de la acción de un antígeno (Ag) en un individuo genéticamente susceptible. La naturaleza del factor desencadenante es desconocido y podría tratarse de un antígeno exógeno o un autoantígeno. Se considera de origen autoinmune ya que existe asociación entre la aparición de distintos autoanticuerpos como el FR y los anti-CCP, con el desarrollo de la AR [1, 2]. La identificación y caracterización del FR como un autoantígeno presente en pacientes con AR fue la primera prueba directa de que la autoinmunidad desempeña un papel principal en la enfermedad. Desde el punto de vista serológico el 80% de los pacientes presentan FR, este grupo representa a la denominada AR seropositiva, mientras que el 20% restante que carece de dicho marcador constituye la AR seronegativa [3, 4].

El principal blanco antigénico en la AR es la membrana sinovial de las articulaciones diartroideas, afectando a ligamentos, cabezas óseas y cartílagos que las recubren. Se caracteriza por una sinovitis inflamatoria persistente en articulaciones periféricas con distribución simétrica, hiperplasia sinovial, dolor, destrucción y distintos grados de deformidad articular en fases avanzadas, que conllevan a una discapacidad funcional. Aunque la AR es una enfermedad de las articulaciones, puede producir manifestaciones extraarticulares en 30% de los pacientes, lo que demuestra claramente que es una enfermedad generalizada capaz de afectar a sistemas y órganos principales [5].

La AR es la artritis inflamatoria más común, afectando principalmente durante la etapa productiva de la vida. Su distribución es mundial y su prevalencia es de aproximadamente 1% de la población adulta; en cuanto al género es de 3:1 mayor en las mujeres, siendo el rango de edad de mayor incidencia entre los 40-60 años [6, 7]. En el caso de los hombres, la prevalencia es más baja antes de los 45 años, pero

aumenta conforme la edad para ambos géneros. Es poco común en personas mayores de 70 años, denominándose en estos casos como de “Inicio tardío”. No debe ser catalogada como una enfermedad propia de la edad avanzada, ya que puede afectar a infantes [8].

La AR es una enfermedad altamente incapacitante, a 10 años de iniciada la enfermedad menos de 50% de los pacientes continúa trabajando, 25% presentan limitaciones importantes y 10% tendrá un grado de discapacidad total. La AR ocasiona una disminución del 50% en los ingresos económicos familiares, ya que estos pacientes condicionan un costo 3 veces mayor en cuidados médicos, 2 veces más en hospitalizaciones y 4 veces mayor en consultas médicas que la población normal. La expectativa de vida se reduce en promedio de 5-10 años [9].

La destrucción articular irreversible puede ser prevenida por la intervención temprana con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMES) durante los primeros tres meses de la AR, ya que en este periodo crítico de ventana terapéutica son más efectivos que si se administran en etapas tardías del padecimiento, reduciendo el daño articular y mejorando su función [10]. Para usar estos tratamientos se requiere de un diagnóstico adecuado en las fases tempranas de la AR, no obstante en estas etapas aún no se han presentado todos los parámetros clínicos para confirmar la enfermedad, por esto las pruebas de laboratorio son de gran importancia siendo indispensable la determinación de autoanticuerpos específicos, adicionalmente a los test serológicos para su diagnóstico [11].

III. ANTICUERPOS PÉPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS

Los péptidos citrulinados son proteínas que contienen residuos de citrulina, la cual es precursora de la biosíntesis de la arginina (R), esta última sintetizada a partir de ornitina con adición de amonio y dióxido de carbono [12]. La citrulina es un aminoácido postraduccionales sintetizado a partir de la modificación de la R, mediante la intervención de la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD), la cual hidroliza los grupos imino. Durante el mecanismo de citrulinación de la R, uno de sus átomos de nitrógeno terminal es atacado por un residuo de cisteína de la enzima PAD para establecer un aducto tetraédrico al tiempo que se libera amonio como subproducto. Posteriormente el aducto es separado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua, que regenera el residuo de cisteína y forma el grupo ceto [13].

El paso de R a citrulina produce una ligera variación en cuanto al cambio de la masa molecular de los aminoácidos y la pérdida de su carga positiva. El grupo imino de la R tiene carga positiva, pero al sufrir esta modificación y convertida a citrulina, adquiere las características de una molécula con carga neutra, la cual es reconocida por los anti-CCP en forma independiente [14]. Este cambio en las cargas implica una variación en la estructura terciaria de la proteína, incremento en su desdoblamiento e hidrofobicidad, aumentando sus características antigénicas por la aparición de epítopes crípticos en la proteína. Estos cambios pueden llevar a la ruptura de la tolerancia hacia la citrulina y el inicio de una respuesta autoinmune [15].

Se han descrito 5 isotipos de la enzima PAD en los tejidos de mamíferos (PAD1-4 y PAD6). PAD1 se encuentra expresada en tejido epidérmico y útero. PAD2 y PAD4 son los más relevantes en la AR, ya que PAD2 es expresada en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales, útero, etc., mientras que PAD4 se encuentra presente en el núcleo de granulocitos y monocitos. PAD3 se expresa en folículos, mientras que PAD6 se encuentra en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica. La principal diferencia entre los isotipos es su expresión específica en los diferentes tejidos [16]. Los sustratos de las PAD son proteínas que tienen funciones estructurales, por ejemplo, filamentos intermedios, histonas, queratina, fibrina, entre otros. Normalmente las enzimas PAD están presentes intracelularmente como enzimas inactivas y para su activación se requiere un incremento en la concentración de iones calcio. La concentración intracelular normal de iones calcio (10^{-7} mol/L) es mucho más baja que la necesaria para activar a la PAD (aproximadamente 10^{-5} mol/L). Sin embargo, durante procesos apoptóticos se pierde la integridad de la membrana plasmática provocando infiltración

de calcio del espacio extracelular, lo cual conlleva a la subsecuente activación de las PAD intracelulares. Alternativamente, las enzimas PAD pueden fugarse hacia las células moribundas y estando ahí pueden activarse, lo cual puede ser la causa de la citrulinación de proteínas extracelulares [17].

Los anti-CCP son producidos localmente por células plasmáticas en líquido sinovial y sinovium inflamado, probablemente estimulados por un sustrato citrulinado presente en pacientes con AR. Los blancos antigénicos de los anti-CCP son aquellos sitios en la secuencia de aminoácidos de proteínas como fibrina, colágena tipo I y II, filagrina y vimentina, que fueron generados mediante la conversión de residuos de R a peptidil citrulina por la enzima PAD [18]. El descubrimiento de los anti-CCP evolucionó a partir de trabajos enfocados a identificar autoanticuerpos distintos al FR en suero de pacientes con AR. De estos estudios se describió a la familia de ACPC y constituyen un creciente número de autoanticuerpos, que incluye los anticuerpos antifactor perinuclear (AFP), antiqueratina (AKA), antifilagrina, antifibrina citrulinada, antivimentina citrulinada (anti-Sa), Anti-Ra33 y anti-CCP [19, 20].

Nijenhuis y Mandema describieron al primer miembro de esta familia, los AFP en pacientes con AR, los cuales son encontrados solo en 1% de controles clínicamente sanos [21]. Young y colaboradores reportaron autoanticuerpos que reaccionaban en contra de proteínas del revestimiento epitelial queratinizado, los cuales fueron llamados AKA y eran positivos en 40-60% de pacientes con AR [22]. Ambos autoanticuerpos reportaban una especificidad entre el 73-99%, lo cual los convertía en prometedores marcadores diagnósticos de la enfermedad. No obstante, presentaban inconvenientes como su baja sensibilidad, dado que no todas las células de la mucosa oral humana expresan el sustrato antigénico y los requerimientos rigurosos de la técnica de detección que limitaban su uso como una prueba rutinaria de laboratorio.

Simon y colaboradores encontraron que el 75% de los sueros de pacientes con AR reconocían a una proteína de 40 kDa aislada de tejido epitelial humano, la filagrina, demostrando que ésta es el blanco antigénico de los AKA [23]. Sebbag y colaboradores reportaron que tanto los AKA y AFP tenían como blanco antigénico la proteína filagrina y la pro-filagrina humana, por lo tanto estos anticuerpos se denominan actualmente antifilagrina (AFA) [24].

La filagrina es una proteína involucrada en la agregación de filamentos de citoqueratina intracelular, producida durante estados tardíos de la diferenciación terminal de células epiteliales en mamíferos. Es sintetizada como una proteína precursora fosforilada llamada profilagrina de 400 kDa que consiste de 10-12 repeticiones de filagrina de una secuencia homóloga, pero no idéntica, de 324 aminoácidos. La profilagrina es depositada en gránulos y la filagrina es liberada por proteólisis durante la diferenciación celular. Durante este estado, los polipéptidos son defosforilados y aproximadamente 20% de los residuos de R son convertidos en citrulina por la enzima PAD. La gran heterogeneidad en la secuencia de aminoácidos de la filagrina, en donde 30-40% de sus residuos de aminoácidos de sus unidades repetidas son variables, y la citrulinación de los residuos de R, da como resultado una gran heterogeneidad en su carga [25].

Un importante descubrimiento realizado por Schellekens y colaboradores, describió que son necesarios los residuos de citrulina para que anticuerpos específicos reconozcan a la filagrina; así se inició la era de los anti-CCP, los cuales reconocen fácilmente estos residuos. Se encontró que el 76% de los pacientes con AR en su grupo de estudio presentaban estos anticuerpos específicos, los cuales podían interactuar con péptidos sintéticos que contenían citrulina [26]. Posteriormente, se demostró que cerca del 20% de los aminoácidos R de la filagrina se convertían a citrulina por acción de la PAD durante la citrulinación. La conversión de R a citrulina en ciertas proteínas, como la filagrina, fibrina y vimentina, es esencial para el reconocimiento antigénico de los AFA (APF y AKA), por lo tanto pueden ser ampliamente categorizados como ACPC. Se ha demostrado la presencia de proteínas citrulinadas como filagrina, fibrina y vimentina en el sinovium reumatoide [27].

La citrulinación no es un evento específico de la membrana sinovial, también puede presentarse en procesos inflamatorios y en etapas tardías de procesos apoptóticos. Una teoría es que algunas proteínas puedan citrulinarse bajo condiciones patológicas, como puede ser el caso de la fibrina en el tejido sinovial. Se han descrito pocas proteínas citrulinadas en células de mamíferos (por ejemplo: proteína básica de mielina, fibrinógeno, filagrina, trichialina y la vimentina citrulinada en los MΦs), pero ninguna de ellas se expresa en el tejido sinovial sano [28]. Recientemente, un estudio demostró la citrulinación de proteínas sinoviales en modelos murinos de AR, lo cual ocurre como un proceso activo debido a la presencia de PAD, pero no se hallaron anti-CCP, lo cual sugiere que la inducción de autoanticuerpos contra las proteínas citrulinadas es específica de los humanos [29].

IV. MECANISMO DE PÉRDIDA DE LA TOLERANCIA HACIA LOS ANTI-CCP

Los eventos iniciales que conllevan a la pérdida de la tolerancia hacia los anti-CCP son inciertos. Sin embargo, se han propuesto modelos para explicar el papel de la citrulinación de proteínas en la inmunopatogénesis de la AR. Este modelo, denominado “Ciclo de la AR”, está conformado por 5 pasos.

- 1) Un trauma, infección o una simple inflamación, ya sea en una articulación o tejido del cuerpo, puede conducir a la infiltración de células inflamatorias como granulocitos, monocitos y linfocitos. En situaciones normales, estas células infiltrantes son eliminadas vía apoptosis y aclaradas por los fagocitos. Sin embargo, cuando existe una señal de apoptosis masiva, por ejemplo debido a una infección, tóxicos o por un defecto genético en el sistema de aclaramiento, algunas células apoptóticas se convierten en necróticas. Los granulocitos, monocitos y MΦs contienen enzimas PAD que pueden ser activadas por la elevación de la concentración citosólica de calcio [30, 31].
- 2) Cuando las células inflamatorias apoptóticas no son apropiadamente aclaradas se convierten en necróticas, liberando proteínas citrulinadas intracelulares como por ejemplo histonas, vimentina, entre otras, así como enzimas PAD activadas como la PAD2 y 4, las cuales son capaces de citrulinar a proteínas sinoviales extracelulares como la fibrina. En la AR existe la presencia de un gran número de proteínas citrulinadas en el sinovium inflamado, sin embargo, la sola presencia de proteínas citrulinadas no necesariamente conduce a una inflamación crónica porque en 99% de estos individuos las proteínas citrulinadas son degradadas sin una reacción humoral del sistema inmune [32].
- 3) Sin embargo, en individuos susceptibles y un microambiente propicio, estas proteínas citrulinadas se comportarían como neoantígenos, siendo reconocidas y presentadas por las CPA en contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Esto conduciría a una respuesta inmune hacia los péptidos citrulinados, desencadenando una respuesta mediada por linfocitos T (LT), los cuales estimularían a linfocitos B (LB) para generar anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPC) de tipo IgG altamente específicos. La activación de LB autorreactivos puede ser local en la articulación inflamada o bien en otros tejidos inflamados. A través de la circulación, los ACPC o las células plasmáticas que los producen llegan a la articulación, independientemente del sitio de activación de sus LB productoras. Hay evidencia experimental de que los ACPC son producidos en las articulaciones de AR y puede mediar el daño al tejido. Por otra parte el fibrinógeno citrulinado, la vimentina y las histonas son capaces de inducir artritis en ratones transgénicos DR4-IE. Estas observaciones directamente implican al fibrinógeno citrulinado como artritogénico en el contexto de AR [33].
- 4) Después de su producción fuera o dentro del sinovium inflamado, los ACPC reaccionan con los abundantes antígenos citrulinados disponibles, formando inmunocomplejos. El grupo de trabajo de Zhao y colaboradores fue el primero en demostrar la presencia de inmunocomplejos en circulación plasmática, así como en el sinovium inflamado de pacientes con AR. Los

inmunocomplejos estimulan el proceso inflamatorio por activación del sistema del complemento, reclutamiento y activación de granulocitos, monocitos y MΦs por la vía de receptores del complemento y receptores Fcγ dependientes. De esta forma, las ACPC contribuyen a la perpetuación de la inflamación articular, la cronicidad y severidad de la AR [34, 35].

- 5) Monocitos y granulocitos entran al sinovium, donde serán activados, subsecuentemente morirán y liberarán otra carga de enzimas PAD activadas. Una nueva ronda de antígenos citrulinados y producción de ACPC tendrá lugar, conduciendo a una nueva señal de inflamación. Se ha observado que la producción de anticuerpos IgM por los LB es continuamente reclutada a la articulación inflamada, demostrando que la respuesta ACPC es continuamente reactivada durante el curso de la AR. Todo esto sugiere el importante papel de los LB y los anti-CCP en la patogénesis de AR. La prolongación de este mecanismo por varios años, eventualmente acompañado por traumas o eventos medioambientales que estimulen la inflamación, conducirá a la inflamación crónica que se manifestará como AR [36-38].

Adicionalmente a este modelo, se han involucrado otras posibles causas que pueden contribuir a la pérdida de la tolerancia y desarrollo de Ac anti-CCP, incluyendo factores genéticos, hormonales y ambientales, en conjunto con inflamación sistémica o local.

V. IMPORTANCIA DE LOS ANTI-CCP EN EL DIAGNÓSTICO DE LA AR

Actualmente la prueba de anti-CCP es considerada un excelente “Marcador Diagnóstico de la AR”, al cumplir con tres requisitos esenciales:

- 1) Buena sensibilidad, al detectar a un alto porcentaje de pacientes.
- 2) Buena especificidad, limitando resultados falsos positivos.
- 3) Presencia en fases tempranas, facilitando un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Las primeras pruebas desarrolladas para determinar anti-CCP reportaron una sensibilidad entre 60-80%, las cuales no sobrepasaban significativamente la sensibilidad del tradicional FR. Aun así, el hecho de que 40-60% de pacientes con FR negativo sean positivos para anti-CCP aumenta su valor diagnóstico. Además, los anti-CCP sólo son detectados en 1-5% de controles clínicamente sanos, mientras el FR puede aparecer en más del 20% [39]. Las pruebas actuales para la determinación de los anti-CCP tienen una alta especificidad para AR (95-100%), en especial con las pruebas de segunda generación (anti-CCP2): sensibilidad del 66-88% y especificidad del 90-99% (Tabla 1). La especificidad combinada con la presencia temprana en la enfermedad demuestra su importante papel en la patogénesis de AR.

Tabla I. Comparación de sensibilidad y especificidad de las pruebas de anti-CCP y FR en pacientes con AR.

anti-CCP		FR		Referencia
Sensibilidad %	Especificidad %	Sensibilidad %	Especificidad %	
70-80	95-98	75-85	80-90	40
41	98	62	84	15
88	96	70	82	32
67	95	69	85	41
74.2	97.8	80.4	93.5	42
55-80	98	68-81	60-85	43
68	96	75	74	44
63.2	95.5	59.1	91.1	45
68	96	63	82	46
76	90	72	80	47
74	98	42	88	48
68	98	54	81	49

Se han realizado estudios para evaluar la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de los anti-CCP y el FR en diversas poblaciones, sin embargo se han encontrado variación en los resultados los cuales pueden relacionarse a las diferencias en los puntos de corte para la positividad debido a los protocolos metodológicos empleados, los distintos criterios en la selección de los pacientes con diferentes grados de duración y severidad de la enfermedad, y la presencia de variables confundibles, tal como la intervención terapéutica en los grupos que fueron examinados [44, 50]. La excelente especificidad de los anti-CCP le otorga valor en el diagnóstico diferencial de enfermedades artríticas. Los anti-CCP permiten distinguir entre pacientes con AR de otras enfermedades artríticas que mimetizan o completan los criterios de AR, donde el FR no es discriminativo [51, 52]. Uno de los primeros ejemplos que ayudaron a evidenciar el papel de los anti-CCP en el diagnóstico diferencial de AR, proviene de estudios en pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), los cuales presentan poliartritis erosiva a menudo se acompañada de FR (+). De los pacientes con LEG que no presentaban artritis erosiva, sólo 0.5% presentaron anti-CCP (+), contrastando con 18% de FR (+) [53]. Esto confirma que la determinación de anti-CCP es una herramienta muy importante en el diagnóstico diferencial de AR (Tabla 2).

Tabla II. Prevalencia de anti-CCP en diferentes enfermedades reumáticas.

Enfermedad	Prevalencia (%)	Referencia
Artritis Psoriásica	5.6 -17.7%	26, 39, 54
Síndrome de Sjögren	7.5%	26
Infección crónica por VHC con Artralgias.	5.7%	45
Polimialgia Reumática	0%	48, 52, 55
Reumatismo Palindrómico	56.3%	48, 56
Lupus Eritematoso Generalizado	0.5-6.2%	42, 55
Osteoartritis	0%	57
Artritis por cristales	0%	48
Artritis Reumatoide Juvenil	25%	18
Enfermedades del tejido conectivo	8%	54
Dermatomiositis	0%	48
Espondilitis Anquilosante	0%	50
Enfermedad de Behçet	2.2%	58

Otra enfermedad con dificultades en su diagnóstico por la presencia de artropatías similares a AR, es la infección crónica por virus de hepatitis C (VHC), que se acompaña de FR (+) en 30-60% de los casos. La prevalencia tan baja de anti-CCP en pacientes infectados con VHC relacionado a artralgias (5.7%), sugiere que los anti-CCP son marcadores para distinguir entre artropatías relacionadas al VHC de la AR. La infección por VHC puede disparar una serie de cambios en el sistema inmune, lo cual podría generar inmunocomplejos circulantes, y reacciones cruzadas entre inmunoglobulinas inducidas por VHC y anti-CCP [45].

El diagnóstico diferencial entre AR de reciente inicio y Polimialgia Reumática (PMR) en adultos mayores puede ser difícil de diagnosticar debido a la ausencia de marcadores séricos. La presencia de anti-CCP (+) en pacientes con síntomas de PMR, conlleva a un diagnóstico de AR de reciente comienzo y la ausencia de anti-CCP (-), un diagnóstico de PMR. Estos datos en conjunto, claramente perfilan el poder diagnóstico del test anti-CCP para la AR [20, 40]. El 56% de pacientes con Reumatismo Palindrómico (RP), presentan anti-CCP positivo, porcentaje similar al de los pacientes con AR temprana (55%). Los pacientes con RP tienen FR en un 30-60%, lo que sugiere que podría ser una forma abortiva de AR. Un estudio reportó que el 83% de los pacientes con RP y positivos a anti-CCP desarrollaron AR al cabo de 6 años, sin embargo se requieren más estudios de seguimiento al respecto [42, 58].

Los anti-CCP han sido detectados en el suero de niños con Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ), particularmente en aquellos con una presentación poliarticular y FR positivo, el porcentaje es variable, dependiendo de las técnicas utilizadas (14-25%). Pacientes con síndrome de Sjögren primario presentan positividad a anti-CCP, siendo detectado en aproximadamente el 8% de ellos. También pacientes con Artritis Psoriásica (APS) expresan anti-CCP (+) (6-8%), por lo tanto se puede decir que los anti-CCP no son comunes en APS y que son encontrados más frecuentemente en pacientes con características de AR. Sin embargo se requieren más estudios para establecer si los anti-CCP pueden predecir el desarrollo de la AR a partir de otras enfermedades artríticas similares [20, 50, 54].

VI. VALOR PREDICTIVO DE LOS ANTI-CCP EN PACIENTES CON AR

Los pacientes con AR no siempre presentan los síntomas y signos característicos en las etapas tempranas de la enfermedad lo que dificulta su diagnóstico, ya que no completan los criterios de clasificación establecidos por el ACR. Los marcadores de fase aguda y las imágenes obtenidas por medio de rayos X pueden ser normales en 60-70% de los pacientes en el comienzo de la enfermedad. Es aquí en donde los anti-CCP adquieren un alto valor predictivo, ya que pueden ser encontrados en etapas muy tempranas, algunas veces durante la fase pre-clínica y su presencia predice el progreso de la AR. Diversos estudios reportan que los anti-CCP están presentes en al menos el 55% de los pacientes con AR temprana [39, 51, 59].

Estudios realizado en donantes de sangre los cuales se encontraban clínicamente sanos 10 años antes de la aparición de las primeras manifestaciones clínicas de AR, reportaron la presencia de anti-CCP en 39% de donantes sanos 5.3 años en promedio antes de la aparición de los síntomas de AR. Es decir, personas sanas las cuales presentan anti-CCP (+) son más propensos a padecer AR que aquellas pacientes negativos a la prueba [50, 60]. El valor predictivo de los anti-CCP es superior al del FR-IgM ya que en personas de edad avanzada y otras condiciones inflamatorias son consideradas como factor de riesgo para falsos positivos de FR. Reportes han descrito un valor predictivo positivo para el desarrollo de AR del 97% y la determinación conjunta de anti-CCP y FR al principio de los síntomas mostró un valor predictivo para positivos del 100%. También se confirmó que la especificidad de los anti-CCP para AR de recién comienzo (menor a 3 meses) es del 96% [14, 19, 41, 52].

En estudios de seguimiento, se obtuvo que el valor predictivo de los anti-CCP en un grupo de pacientes con Artritis indiferenciada fue del 93% y luego de 3 años de seguimiento, los pacientes que dieron positivo a la prueba de anti-CCP fueron clasificados con diagnóstico de AR. Sólo el 25% de los pacientes con CCP (-) van a completar los criterios del ACR y desarrollaron AR en 3 años de seguimiento. La determinación de anti-CCP en la AR temprana, contribuye a facilitar el diagnóstico de la AR, tanto como una prueba individual, como en combinación con el FR (Tabla 3).

Tabla III. Comparación entre valores de FR y anti-CCP en AR Temprana (NA: No Aplicado).

Ensayo: anti-CCP1 /CCP2	Seguimiento (años)	Sensibilidad anti-CCP (%)	Especificidad anti-CCP (%)	Sensibilidad FR (%)	Especificidad FR (%)	Sensibilidad combinada (%)	Especificidad Combinada (%)	Referencia
CCP2	2	39-50	93-98	31-54	91-93	30-39	98-100	50
CCP1	2	43	98	50%	93	33	98	52
CCP2	2	44	96	31	92	NA	NA	41
CCP1	2	47	93	NA	NA	NA	NA	42
CCP2	1	39	96	35	92	30	100	43
CCP1	1	76.1	92	68.5	77.1	NA	NA	56
CCP2	1	61.4	100	54.4	83.7	NA	NA	47
CCP2	1	62	97	64	90	32	92	48
CCP1	1	48	96	54	91	39	98	119
CCP2	3	50	97	NA	NA	NA	NA	26

Los anti-CCP (+) parecen definir un fenotipo de AR caracterizado por una mayor actividad de la enfermedad y un curso más rápido de destrucción articular, por lo tanto, daño radiológico más severo, discapacidad funcional y una enfermedad que probablemente será beneficiada con terapias antirreumáticas en etapas muy tempranas, en comparación con pacientes anti-CCP (-) [62]. El conteo de articulaciones deformadas e índices radiográficos son más altos en pacientes con AR anti-CCP (+), que en aquellos con anti-CCP (-). La agresividad de la AR es valorada como progresión radiológica. La determinación de anti-CCP en fases tempranas de la AR permite una buena predicción de mayor afectación radiológica e índices de Larsen más altos [20].

En un estudio realizado por Meyer y colaboradores, dirigido a la progresión del daño radiológico en la AR, se determinó los niveles de anti-CCP en 273 pacientes con por lo menos 1 año de síntomas, los cuales fueron seguidos por lo menos 6 años con mediciones radiográficas en manos y pies cada 6 meses. Los pacientes con anti-CCP (+) presentaron mayor daño radiológico que aquellos pacientes anti-CCP (-). El FR también se encuentra asociado con incremento en el daño radiológico en 6 años. Sin embargo, los anti-CCP identificaron a un gran grupo de pacientes con riesgo incrementado de daño, los cuales no pudieron ser identificados solo con el FR. Resultados similares fueron obtenidos por Kroot y colaboradores. Así, los anti-CCP pueden ser útiles en identificación de grupos de pacientes con AR, en los cuales es mayor la probabilidad de desarrollar daño y en los cuales no se pueden identificar sólo mediante la prueba de FR. Forslind y colaboradores reportaron que la positividad del anti-CCP predice progresión y daño radiológico a los 2 años de seguimiento [61].

Aunque los anti-CCP se han asociado a AR erosiva y severa, no se ha podido demostrar una correlación positiva entre anti-CCP y manifestaciones extra-articulares. La presencia de nódulos subcutáneos se relaciona con niveles de FR, pero no con los de anti-CCP. Muchos factores pueden afectar estos resultados, incluyendo el tamaño de las muestras de pacientes, duración de la enfermedad y tratamiento. Se requiere seguimiento a largo plazo para entender la asociación entre anti-CCP y manifestaciones extra-articulares.

VII. IDENTIFICACIÓN DE ANTI-CCP EN EL LABORATORIO

Schellekens y colaboradores comprobaron que los anti-CCP no se dirigían contra toda la molécula de filagrina sino contra ciertos fragmentos citrulinados de esta molécula, y comprobaron que la citrulinación era necesaria para que las moléculas de filagrina fueran reconocidas por los autoanticuerpos específicos de la AR. Además desarrollaron un primer estudio con la técnica de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) empleando fragmentos citrulinados lineales de filagrina combinando 9 variantes de péptidos citrulinados, con el que obtuvieron una sensibilidad del 76% para la AR, con una especificidad del 96% [26]. Si bien esta técnica es sencilla y reproducible, el hecho de tener que precisar varios péptidos para llegar a la citada especificidad dificultaba su estandarización y aplicación clínica. El mismo grupo de trabajo resolvió el problema mediante la modificación de los péptidos citrulinados, en concreto mediante el ciclado de algunos de los péptidos. El desarrollo de un ELISA con péptidos cíclicos mejoraba la sensibilidad y especificidad de los primeros péptidos citrulinados lineales, llegando a una sensibilidad del 68% y con una especificidad del 98% para la AR. Los péptidos cíclicos citrulinados han resultado tener mayor reproducibilidad. Este test para anti-CCP se hizo disponible comercialmente en el año 2000 y se conocieron como ensayos anti-CCP de primera generación (anti-CCP1) [63].

En ese tiempo se proponía que la filagrina actuaba como un agente desencadenante de la autoinmunidad, pues no se expresa en la membrana sinovial, por lo tanto se eligió aleatoriamente de una gran biblioteca de péptidos citrulinados a los epítopes de mayor rendimiento (péptidos más reactivos y específicos); los elegidos se emplearon como antígenos para estas pruebas de ELISA. Esto dio origen a

la segunda generación de pruebas: anti-CCP2. Los anti-CCP2 han mostrado mejores características que los anti-CCP1, con una especificidad cercana al 80% y una especificidad de 98-99%. Además pueden ser detectados tempranamente en la enfermedad y han estado disponibles comercialmente desde el año 2002 y actualmente son los ensayos mayormente empleados para detectar anti-CCP [64].

La prueba para detectar anti-CCP se basa en la técnica de ELISA para la detección cuantitativa de Ac IgG contra los péptido citrulinados en el suero de pacientes. La metodología emplea placas de 96 pozos cubiertas con residuos de Arginina modificados que contienen péptidos cíclicos sintéticos purificados, los cuales son incubados por 60 minutos a 20°C. Posteriormente se adicionan los controles positivos, negativos, soluciones estándar y las muestras a evaluar en cada pocillo. Después de 3 lavados, las placas se incuban por 30 minutos a 20°C con fosfatasa alcalina-Ac monoclonal murino dirigido contra IgG humana. Luego de otros 3 lavados, y antes de que la reacción enzimática haya procedido por 30 minutos, es detenida por adición del búfer NaOH-EDTA-carbonato. La absorción producida es leída en un espectrofotómetro a una amplitud de onda de 550 nm. Las concentraciones de anti-CCP son estimadas por interpolación de una curva dosis-respuesta basada en conocimientos de la concentración de los estándares. El anti-CCP es considerado positivo cuando la concentración derivada de la absorbencia sea más alta que la del punto de corte [63].

Diversos distribuidores (Euro-Diagnostica en Países Bajos; Axis-Shield Diagnostics, Reino Unido; Inova Diagnostics Inc., EUA) han desarrollado diversos Test anti-CCP2. CCP2 es una marca de fábrica y todos los inmunoensayos comerciales disponibles usan el mismo Ag y la misma placa cubierta de Ag, pero difieren en cuanto al procedimiento de trabajo. Los resultados de los 3 ensayos son similares [41, 51].

Los resultados se expresan en unidades/mililitro (U/mL), y los valores de corte dependen del kit utilizado. La ELISA de INOVA clasifica como negativos <20 U/mL, débil positivo 20-39 U/mL, positivo moderado 40-59 U/mL y fuerte positivo >60 U/mL. El rango entre 25 y 50 U/mL debe ser interpretado por el médico en el contexto clínico del paciente. Actualmente hay una prueba de tercera generación (anti-CCP3). Sin embargo, hay un contraste en cuanto a los resultados obtenidos con la mezcla de Ag del CCP3: algunos estudios reportan que aumenta la sensibilidad en este ensayo, y otros que no han podido reportar ventajas (Tabla 4).

Tabla IV. Comparación entre Especificidad y Sensibilidad de anti-CCP1, anti-CCP2 y anti-CCP3 en la AR (NA: No Aplicado).

anti-CCP1		anti-CCP2		anti-CCP3		Referencia
Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	
44-56	90-97	64-89	88-99	NA	NA	50
68	97	80	98	NA	NA	65
NA	NA	66-88	90-99	NA	NA	52
68	98	82	98.5	NA	NA	18
68	96	66-82	90-98	NA	NA	64
NA	NA	80%	98%	NA	NA	33
68	95	53	96	NA	NA	47
NA	NA	62.8	95.6	65.1	96.7	63

VIII. CONCLUSIONES

El curso impredecible y altamente variado de la AR sugiere la necesidad de realizar pruebas diagnósticas que sean altamente sensibles y específicas para su oportuna detección. Actualmente, la determinación de anti-CCP como prueba de laboratorio ha sido incluida dentro los criterios de clasificación de la ACR contribuyendo al diagnóstico de la AR en conjunto al FR. Las ventajas de la

determinación de los anti-CCP son: mayor sensibilidad (determinación de un mayor número de casos) y elevada especificidad, además de que se trata de una técnica cuantitativa, de fácil realización y gran reproducibilidad, lo que permite su estandarización y la posibilidad de ser utilizada por la mayoría de los laboratorios de inmunología y por tanto, permitir su aplicación en la clínica diaria, con posibilidad de utilización extensiva. Los anti-CCP no sustituyen al FR, pero sí que pueden aportar datos complementarios para el diagnóstico y para el pronóstico de la AR.

La determinación de los anti-CCP resulta de mayor valor diagnóstico cuando el FR no es detectable. La sensibilidad si se reduce cuando se separan anti-CCP y FR, de tal forma que los reumatólogos recomiendan la combinación de ambos marcadores, especialmente para AR temprana. La combinación de Ac anti-CCP y FR-IgM positivos mejora la especificidad del FR por separado. Medir FR-IgM en pacientes que ya se sabe que son CCP (+), podría predecir manifestaciones extraarticulares. Las personas sin AR que han dado positivo para FR y que no tienen anti-CCP positivo, permanecerán sanas.

Los anti-CCP son los marcadores serológicos más específicos que se conocen para la AR. En los últimos años se han reportado evidencias del alto valor diagnóstico de los anti-CCP en estados iniciales de la AR, lo cual sería particularmente relevante para un pronto diagnóstico definitivo de la AR, ya que actualmente el diagnóstico se basa en criterios clínicos y radiográficos usualmente detectados cuando ya existe algún grado de daño estructural irreversible en las articulaciones. Es por esto que se considera que los anti-CCP tienen un alto valor predictivo positivo para identificar pacientes que desarrollarán AR definitiva y así comenzar un tratamiento temprano que mejore la calidad de vida del paciente a largo plazo.

Distintas investigaciones han demostrado que los anti-CCP muestra un buen balance entre sensibilidad y especificidad. Están presentes en al menos 70-80% de los pacientes estudiados, con una especificidad del 95-100%. Esta alta especificidad combinada con su presencia en etapas tempranas de la AR, incluso antes que la enfermedad se manifieste, sugiere su importante papel predictivo y patogénico en la AR.

REFERENCIAS

- [1] Avidson, A. D.; Diamond, B. Autoimmune Diseases. *N Engl J Med.* 2001; 345 (5):340-350.
- [2] Firestein, G. S. "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." *Nature.* 2003; 423(6937):356-361.
- [3] Symmons, D.P.M. "Looking back: rheumatoid arthritis aetiology, occurrence and mortality." *Rheumatology (Oxford)* 2003. 44: (Suppl. 4):iv14-iv17.
- [4] Edwards, C. J.; Cooper, C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2005. 143:1-5.
- [5] Symmons, D. P.; Silman, A. J. Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res Ther.* 2006. 8(214):1-6.
- [6] Solomon, D H.; Tyndall, A.; Gabriel, S E. Rheumatology gone global. *Ann Rheum Dis.* 2008, 67: 1357.
- [7] Delgado-Vega, A.; Martín, J.; Granados, J.; Anaya, J. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿Qué esperar de América Latina? *Biomédica*, 2006. 26: 562-84.
- [8] Fontaine, K.; Haaz, S.; Moonseong, H. Projected prevalence of US adults with self-reported doctor-diagnosed arthritis, 2005 to 2050. *Clin Rheumatol.* 2007. 26:772-774.
- [9] Nemegeyi, J.A. et al. Enfermedades reumáticas y discapacidad laboral en población adulta rural. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (4) pp: 287-292.
- [10] Wagner, U.; Kaltenhauser, S.; Pierer, M.; Seidel, W.; Tröltzsch, M.; Häntzschel, H.; Kalden, J.R.; Wassmuth, R. Prospective analysis of the impact of HLA-DR and -DQ on joint destruction in recent-onset rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003. 42: 553-562.

- [11] Mewar, D.; Marinou, I.; Coote, A L.; Moore, D J.; Akil, M.; Smillie, D.; Dickson, M C. Association between radiographic severity of rheumatoid arthritis and shared epitope alleles: differing mechanisms of susceptibility and protection. *Ann Rheum Dis*. 2008. 67: 980-983.
- [12] Vossenaar, E.R.; van Venrooij, W. J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(3): 107-11.
- [13] Vossenaar, E.R.; Zendman, A.J.W.; van Venrooij, W.J. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004, 6:1-5 (DOI 10.1186/ar1027).
- [14] Kaltenhauser, S; Pierer, M; Arnold, S; Kamprad, M; Baerwald, C; Hantzschel, H; Wagner U. Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with the DRB1 shared epitope and predict joint erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007; 46:100–104.
- [15] Bizzaro, N.; Mazzanti, G.; Tonutti, E.; Villalta, D.; Tozzoli, R. Diagnostic Accuracy of the Anti-Citrulline Antibody Assay for Rheumatoid Arthritis. *Clinical Chemistry*. 2001, 47 (6): 1089-1093
- [16] van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: A small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000; 2:249–51.
- [17] E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidyl arginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem*. 1996; 271:30709–16.
- [18] Ferucci, E.D. et al Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide Are Associated With HLA–DR4 in Simplex and Multiplex Polyarticular-Onset Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005, 52 (1): pp 239–246.
- [19] Nishimura, K., et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 2007. 146(11): 797-808.
- [20] Chou, C.T.; Liao, H.T.; Chen, C.H.; Chen, W.S.; Wang, H.P.; Su, KY; The clinical application of anti-CCP in Rheumatoid Arthritis and other Rheumatic Diseases. *Biomarker Insights*. 2007(2):161-171.
- [21] Nijenhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis*. 1964; 23:302–5.
- [22] Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*. 1979; 2:97–9.
- [23] Simon M, Vincent C, Haftek M, Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Serre G. The rheumatoid arthritis-associated autoantibodies to filaggrin label the fibrous matrix of the cornified cells but not the profilaggrin-containing keratohyalin granules in human epidermis. *Clin Exp Immunol*. 1995 Apr; 100(1):90–98.
- [24] M Sebbag, M Simon, C Vincent, C Masson-Bessière, E Girbal, J J Durieux, and G Serre. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. Jun 1995; 95(6): 2672–2679.
- [25] Girbal-Neuhausser E1, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. The Epitopes Targeted by the Rheumatoid Arthritis-Associated Antifilaggrin Autoantibodies are Posttranslationally Generated on Various Sites of (Pro)Filaggrin by Deimination of Arginine Residues. *Lupus*. 2009 Jul; 18(8):713-7.
- [26] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan; 43(1):155-63.
- [27] Herold, M; Boeser, V; Russe, E; Klotz, W. Anti-CCP: History and its usefulness. *Clin & Develop Immunol*, 2005; 12 (2): 131–135.
- [28] López-Hoyos M, Marquina R, Tamayo E, González-Rojas J, Izui S, Merino R, Merino J. Defects in the regulation of B cell apoptosis are required for the production of citrullinated peptide autoantibodies in mice. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug; 48(8):2353-61.

- [29] Vossenaar ER1, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Sep; 48(9):2489-500.
- [30] Kinne, R.W.; Stuhlmüller, B.; Burmester, G.R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Macrophages. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9:224.
- [31] Drexler, K.S; Kong, P.L; Wales, J; Foxwell, B.M. Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10:216.
- [32] Zendman, A.J.M.; van Venrooij, WJ.; Pruijn, GJM. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45:20–25.
- [33] Lundberg, K.; Nijenhuis, S.; Vossenaar, E.; Palmblad, K.; van Venrooij, W.J.; Klareskog, L.; Zendman, AJM.; Erlandsson, H. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R458-R467.
- [34] van Venrooij, W.J.; Pruijn, G.J.M. An important step towards completing the rheumatoid arthritis cycle. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10:117.
- [35] Zhao, X.; L'Okeke, N.; Sharpe, O.; Batliwalla, F.M.; Lee, A.T.; et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10:R94.
- [36] Rengel, I.; Ospelt, C.; Gay, S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9:221.
- [37] Lutzky, V.; Hannawi, S.; Thomas R.; Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Dendritic cells. *Arthritis Res & Ther.* 2007, 9: 219.
- [38] Otero, M.; Goldring, M.B. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9:220.
- [39] Mimori, T. Clinical Significance of Anti-CCP Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Intern Med.* 2005, 44 (11): 1122-1126.
- [40] Symmons, DPM. Classification criteria for rheumatoid arthritis—time to abandon rheumatoid factor? *Rheumatology* 2007; 46:725–726.
- [41] Mezzano V; Lacobelli, S. Anticuerpos Anti-Péptido Citrulinado Cíclico. *Reumatología* 2007; 23(4):137-141.
- [42] Mewar, D.; Coote, A.; Moore, D.J.; Marinou, I.; Keyworth, J.; Dickson, M.C.; Montgomery, D.S.; Binks, M.H.; Wilson, A.G. Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8:R128.
- [43] Nieto-Colonia, A.M.; Santos, W.S.; Keusseyan, S.P.; Caldana, W.; Fernández, A.C.; Andrade, L.E. Antibodies to citrullinated peptides are not associated with the rate of joint destruction in patients with a well-established diagnosis of rheumatoid arthritis. *Braz J Med Biol Res.* 2008. 41(3): 188-192.
- [44] Lee, D M; Schur, P H. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:870–874.
- [45] Cheng Liu, F.; Chao, Y.C; Hou, T.Y.; Chen, H.C.; Shyu, R.S.; Hsieh, T.Y.; Chen, C.H.; Chang, D.M.; Lai, J.H. Usefulness of anti-CCP antibodies in patients with hepatitis C virus infection with or without arthritis, rheumatoid factor, or Cryoglobulinemia. *Clin Rheumatol* (2008) 27:463–467.
- [46] Lopez-Hoyos, M; Ruiz de Alegria, C; Blanco, R; Crespo, J; Peña, M; Rodriguez-Valverde, V; Martinez-Taboada, V. M. Clinical utility of anti-CCP antibodies in the differential diagnosis of elderly-onset rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2004; 43:655–657.
- [47] Santiago, M. et al. A comparison of the frequency of antibodies to cyclic citrullinated peptides using a third generation anti-CCP assay (CCP3) in systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* (2008) 27:77–83.

- [48] Fabien et al. Prevalence of Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptide in Patients with Rheumatic Diseases other than Rheumatoid Arthritis: A French Multicenter Study. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008 34:40–44.
- [49] Papadopoulos, N.K.; Tsiaousis, G.Z.; Pavlitou-Tsiontsi, A.; Giannakou, A.; Galanopoulou, V.K. Does the Presence of Anti-CCP Autoantibodies and Their Serum Levels Influence the Severity and Activity in Rheumatoid Arthritis Patients? *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2008, 34:11–15.
- [50] Niewold, TB; Harrison, MJ; Paget, SA. Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *Q J Med* 2007; 100:193–201.
- [51] Szekanecz, et al. Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets? *Clinic Rev Allerg Immunol* (2008) 34:26–31.
- [52] Kastbom, A.; Strandberg, G.; Lindroos, A.; Skogh, T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1085–1089 [53] Qing YF1, Zhang QB, Zhou JG, Yuan GH, Wei J, Xing Y, Liu JP, Jiang L, Chen JP. The detecting and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009 Jul; 18(8):713-7.
- [54] Inanc, N.; Dalkılıç, E.; Kamalı, S.; Kasapoglu-Günel, E.; Elbir, Y.; Direskeneli, H. Anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol* 2007, 26: 17–23.
- [55] Alessandri, C.; Priori, R.; Modesti, M.; Mancini, R.; Valesini, G. The Role of Anti-Cyclic Cytrullinate Antibodies Testing in Rheumatoid Arthritis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2008 (34): 45–49.
- [56] Alexiou, I.; Germenis, A.; Ziogas, A.; Theodorou, K.; Sakkas, L.I. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2007, 8: 37.
- [57] Finckh, A.; Liang, M. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies in the diagnosis of rheumatoid Arthritis: Bayes clears the Haze. *Ann Intern Med*, 2007; 146: 816-817.
- [58] Koca, S.S.; Akbulut, H.; Dac, S.; Artas, H.; Isik, A. Anti Cyclic Citrullinates Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis and Behçet's Disease. *J. Exp. Med*, 2007, 213 (4):297304.
- [59] Skogh, T. Does a positive anti-CCP test identify a distinct arthritis entity? *Arthritis Res Ther*. 2005, 7:230-232.
- [60] Iwanami K. et al. Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced Arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008, 10:R130.
- [61] Meyer, O; Nicaise-Roland, P; dos Santos, M.; Labarre, C.; Dougados, M.; Goupille, P.; Cantagrel, A.; Sibilia, G. Serial determination of cyclic citrullinated peptide autoantibodies predicted five-year radiological outcomes in a prospective cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006, 8:R40.
- [62] Svärd, A.; Kastbom, A.; Reckner-Olsson, A.; Skogh, T. Presence and utility of IgA-class antibodies to cyclic citrullinated peptides in early rheumatoid arthritis: the Swedish TIRA Project. *Arthritis Res & Ther*. 2008, 10:R75.
- [63] Kitahara, K; Takagi, K; Kusunoki, Y; Nishio, S; Nozaki, T; Inomata, H; Takei, M; Sawada, S; Kawai, S. Clinical value of second and third generation assays of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008, 67: 1059-1060.
- [64] Correa, P; Tobón, J; Citera, G; Cadena, J; Schneeberger, E; Camargo JF; Maldonado-Cocco, J; Anaya, JM. Anticuerpos anti-CCP en artritis reumatoidea: relación con características clínicas, citocinas Th1/Th2 y HLA-DRB1. *Biomédica* 2004; 24: 140-52.
- [65] Quinn, M.A. et al. Anti-CCP antibodies measured at disease onset help identify seronegative rheumatoid arthritis and predict radiological and functional outcome. *Rheumatology* 2005; 45:478–480.