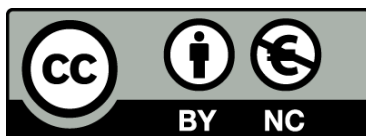




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Nous abordatges en l'estudi de les malalties autoimmunitàries

Albert Pérez Isidro



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESI DOCTORAL

Nous *abordatges* en l'estudi de les **malalties** **autoimmunitàries**

Albert Pérez Isidro
2024



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Departament de Biomedicina
Programa de Doctorat en Biomedicina

NOUS ABORDATGES EN L'ESTUDI DE LES MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES

Memòria presentada per **Albert Pérez Isidro** per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona.

Estíbaliz Ruiz Ortiz de Arizabaleta
Codirectora de la tesi

Gerard Espinosa Garriga
Codirector de la tesi

Montserrat Plana Prades
Tutora de la tesi

Barcelona, Juny de 2024

“El dubte és una virtut de la intel·ligència”

Simone Weil

Diuen que escriure una tesi doctoral és una experiència vital, que cal començar amb ganes i amb força perquè el procés està format per un seguit d'alts i baixos que cal anar superant. Al principi és com quan, a l'estiu, vols banyar-te al mar, però no saps si entrar-hi de cop o si serà millor ficar-t'hi a poc a poc. Del que no ets conscient, és que quan ja siguis a dins de l'aigua no sabràs si estàs prou a prop de la costa per evitar l'atac d'un tauró blanc. A més quan vulguis sortir et semblarà que cap onada és prou feble per no arrebossar-te amb la sorra, però cap té la força necessària per ajudar-te a sortir.

M'agradaria fer servir aquestes línies per poder explicar-vos la meua història vital, sí la de la tesi, però també la de la vida. La veritat és que no sabia definir com ha de ser una vida tipus, si és que n'hi ha. No sé si podria considerar la meua, una vida tipus d'un noi nascut l'any 1988, ni tampoc si l'he viscut com hagués hagut de. De fet, estic força convençut que cada vida és diferent i que cadascú ha de trobar la millor manera de viure-la.

Tot va començar de la mà de dues persones cabdals per al meu desenvolupament i sense les quals no seria avui aquí, la Rosa i l'Albert, els meus pares. Des de ben petit m'han inculcat la creença en l'esforç i la humilitat, en què el "destí" no existeix, tu te l'has de crear, però que té la capacitat de posar les coses al seu lloc, de donar-te allò que et mereixes (no sense abans posar algun pal a la roda). Ells dos han estat els que han confiat en mi en tot moment, fins i tot quan creien que m'equivocava, però jo estava tan convençut que no. Fins i tot en aquells moments, em van deixar volar sabent com acabaria tot. Sens dubte a ells els dec molt i aquesta tesi (si algú la vol entendre com el *culmen* d'una, en aquest cas la meua, carrera acadèmica o formativa) va dedicat a ells, malgrat que el pare no l'ha pogut gaudir.

En tot aquest ambient la família ha estat també molt important, els avis, les àvies, els tiets, les tietes, els de sang i els adoptats (la Rosita i en Joan, la Montse, el Manel, la Dolors, en Jordi, el Gaspar, la Tere, la Glòria i el Fonsu), sempre han promogut, a la seva manera, aquest caràcter investigador i curiós que tots tenim a la família. Han estat, però, "el·ls cosins" (la Briseida, en David, el Roger, la Júlia, el Toni, la Neus, el Sergi, l'Esther, en Felip, la Georgina i el Miquel) el·ls qui han conformat una al·ltra pota

fonamental·l en el·l meu desenvol·lupament. Han participat en molts aspectes, sí en les festes i la xerinola, però també en els dubtes i els plors i en les patacades petites i també en les grans. En aquells moments sempre hi han estat, hi són i hi seran.

L'escola pública catalana sempre ha estat l'encarregada de la meva formació. M'he creuat amb professionals de l'ensenyança i amb persones professionals. La llista seria molt llarga, però vull esmentar-ne tres que han influït de manera significativa en despertar la curiositat dins meu. En Joan Capdevila (el meu tutor a Cicle Superior de la primària), català i catalanista, defensor del pensament crític en el seu màxim exponent, va plantar en molts de nosaltres la llavor del dubte, entès com la curiositat i l'inconformisme gairebé infinit. La Mònica Suïls (la meva professora de biologia durant el batxillerat) qui va aguantar-me fent el meu primer treball "d'investigació", qui va tenir amb mi converses maternals sobre el futur i les capacitats de cadascú, i en Lluís Valls (el meu professor de matemàtiques també durant el batxillerat) que em va fascinar amb la senzillesa dels números, de les fórmules i del fet que sovint, és millor formar individus capaços de trobar noves estratègies que no pas a autòmats especialitzats a resoldre els problemes que ja estan resolts. A més va haver de suportar algunes de les meves sortides de to pròpies de l'adolescència, però a qui ara agraeixo moltes de les seves ensenyances. D'ells tres, però també de tots els altres, en tinc un bon record i un bon grapat d'experiències que han anat esculpint el meu caràcter i la meva manera d'afrontar les dificultats i de gaudir dels èxits, tot amb mesura. Per ells i, sobretot, per encoratjar-los a continuar fent la seva feina tan bé com la fan (malgrat les dificultats), també està dedicada aquesta tesi doctoral.

L'esport ha estat durant la meva vida una eina fonamental, fins i tot puc dir que soc Tècnic Superior en Animació d'Activitats Físiques i Esportives. Aquests estudis m'han aportat la connexió amb molt bona gent i m'ha ajudat a gestionar necessitats emocionals en un moment de dubte vital. Estic convençut que l'esport és una de les eines més potents de les que disposem per transmetre als més petits els valors que com a societat creiem cabdals i que alguns s'encaparren a *informar* que hem perdut, i per això us el vull esmentar en aquestes pàgines. El bàsquet en concret ha estat vinculat a mi

des de ben petit, passant per diverses de les etapes més glorioses de la meua existència, com a jugador però també com a coordinador i entrenador. El bàsquet m'ha donat companys de vida que avui caminen, no al meu costat, però en la mateixa direcció, amb qui comparteixo moments de festa però també de reflexió i creixement personal. L'esport t'ensenya que de tot i tothom, se'n pot i se n'ha d'aprendre, que la càrrega de soluts pròpia (que inclou valors, prejudicis, emocions, caràcters...) sempre ha de permetre l'osmosi d'allò que la persona que t'acompanya és capaç d'oferir. Malgrat que ens van inculcar que la superespecialització era el futur (i està per veure si realment ho serà), Darwin ja va demostrar fa molt temps que aquells perfils amb la capacitat d'adaptar-se més ràpidament estan, malauradament, condemnats a l'èxit. Recordo ara, que quan era entrenador ajudant en un equip de bàsquet vaig assegurar un dia a tots els jugadors i vam intentar definir què és l'èxit (crec que no ho vam aconseguir, però que avui som persones una mica millors), però no us avorriré ara amb una dissertació sobre la meua definició d'èxit. Tornant a l'esport, vull també dedicar tota la feina de les següents pàgines a aquells amb qui m'ha creuat l'esport i que m'han fet ser la persona que soc ara: Jordi Pavón, David Planas, Nora Sánchez, Ramon Carmona, Dani Benítez, Adrià Pibernat, Niko i una llista força llarga de noms.

El destí després de la meua etapa de Batxillerat em va portar a la carrera de Medicina, 18 anys i alguns estereotips van fer que aquest projecte fracassés. Tot i que, vist en perspectiva, no ho titllaria de fracàs, potser diria que no va ser el camí adequat per arribar molt a prop d'on soc ara: defensant una tesi amb un alt percentatge de component clínic i encuriosit per com millorar les eines disponibles, i la seva interpretació, per als metges que tracten als pacients. La universitat és, segons la societat en la qual vivim, el destí final de qualsevol fill, el mínim exigible i la principal font de frustració de les generacions més joves. Ens hem emmirallat en els nostres pares i tiets, alguns van poder fer-ho però d'altres no, i sempre han lluitat perquè tots nosaltres ho poguéssim aconseguir, potser ha estat un error o potser no. Jo hi vaig passar i considero que he provat la frustració que provoca estudiar una carrera que se "t'ha imposat" com l'alegria d'estudiar amb la finalitat d'enriquir el teu coneixement, de saber més.

La següent parada va ser l'Hospital Clínic, bé, més que la institució, les persones que la sostenen. No sé per què tenim tanta facilitat per engrandir a les institucions i, a vegades, ens costa tant valorar les persones que la fan tan important. Aquí —ho dic per dos motius: primer perquè defenso aquesta tesi a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona que està integrada amb l'Hospital Clínic, però també perquè en cada apartat d'aquesta tesi hi ha una mica de cadascuna de les persones que he conegut durant aquests últims anys— com deia, aquí he trobat a les persones que pràcticament avui conformen el meu dia a dia. Els residents del Servei d'Immunologia, la Clara, la Marta, la Natalia, l'Iñaki, el Guille, el Dani gran i el Dani petit, la Jen, el JuanFran, els facultatius, la Laura, el Mario, el Sergio, la Blanca, la Azu, l'Anna, la Mila, el Jordi, el Manel, l'Eduard, altres investigadors, la Sara, l'Ana, la Luo, el Dani, la Berta, el Sergi, els tècnics, la Noe, la Maria, les Judits, la Uma, la Carmen, la María José, la Fina, la Carla, el Víctor, el Cesc, i fora del Servei d'Immunologia tots els metges, residents i rotants amb els qui hem col·laborat, el Raul, el Camilo, el Raimon, la Fernanda, el Joel, el Jacobo, el Marcelo, la Mariana, la Gema, el Sergio, la Rosa, el Ricard, el Pepe, i segur que me'n deixo a molts. Però perquè la facció més jove d'aquest grup d'immunòlegs funcionés a ple rendiment i es trobés a gust hi havia la Raquel, la tutora de residents i la persona que ha fet que a partir de l'ambient de treball passem de ser companys a ser una petita família i la família entre ella s'ajuda i molts d'ells han compartit amb mi els moments més obscurs dels que us parlava al principi, els dubtes, les decepcions, les decisions complicades i, per això també són partícips del fruit d'aquest esforç.

Finalment, diuen que darrere de qualsevol projecte exitós hi ha una dona, jo tinc la sort, no de tenir-ne una, sinó de tenir-ne dues. La meva dona, l'Alexandra i la meva filla, la Naia. Molts coneixeu la meva història d'amor, amb l'Alexandra ens vam conèixer l'1 de Setembre del 2005, quan teníem 17 anys. No hem compartit tot aquest temps (per sort per ella), però la nostra relació es va enfortir a partir del Desembre del 2015, ens vam casar l'Octubre del 2019 i un any més tard, el 4 d'Octubre de 2020, va néixer la nostra filla. L'Alexandra sempre ha estat al meu costat, recolzant-me en els bons moments i fent suport a les idees més esbojarrades que em passen pel cap, però també qui m'ha arrelat a la terra, a la realitat, qui m'ha ensenyat

que la paciència i l'eficàcia (o l'eficiència o l'efectivitat, ja no sé què és cada cosa), són característiques que hem de tenir ben interioritzades. Ella i la Naia son pal de paller, no et deixen volar quan estàs eufòric, esmorteixen el cop quan caus i t'ajuden a aixecar-te, a espolsar-te la camisa i a fer bona cara per tornar-ho a intentar, mai no et donen l'opció de rendir-te. Com diu una d'elles *"si una cosa no surt bé, ho hem de tornar a provar i si torna a sortir malament, ho hem de tornar a provar, però fent alguna cosa diferent"*, i només té tres anys. Tinc la immensa sort de tenir a la millor dona que jo, i la majoria dels mortals, podria tenir i a la millor filla que existeix, que ha aconseguit en tan poc temps fer-me mirar el rellotge cada dos per tres per marxar cap a casa a veure-la, i fer torres i puzles i carreteres i dibuixos i balls i jocs, mentre cuinem macarrons de plastilina o comprem fruita a la botigueta. Sense cap mena de dubte, sense elles dues, avui i ara, jo no seria ni així ni aquí.

Per acabar, vull agrair a l'Odette i l'Estíbaliz, primer de tot per confiar sempre en mi i per donar-me l'oportunitat d'iniciar-me en aquest màgic món de la investigació, per fer-me preguntes i fer que em fes preguntes, per donar-me llibertat i independència, per demostrar-me que la transversalitat en el món laboral pot ser real i per acompanyar-me en aquest camí doctoral. He compartit despatx amb les dues durant més de 5 anys, i encara m'emociono quan recordo les paraules de l'Odette el dia de la seva jubilació *"és el millor període laboral que he tingut"*. Em sento orgullós d'haver-hi contribuït. Això és el que us deia abans de les institucions i les persones.

L'Estíbaliz, junt amb el Gerard, són els directors d'aquesta tesi, hi han posat traves, l'han qüestionat, l'han retocat, però amb això l'han fet créixer i m'han fet créixer (que ben segur era l'objectiu final). M'han fet sentir lligat al projecte i dirigit però també lliure i recolzat. M'han corregit, m'han escoltat, m'han ensenyat i diuen que han après de mi. Se sol dir que als directors de tesi, o els estimes o els odies, jo els estimo a tots dos.

Arribats a aquest punt, només queda parlar del futur, de la incertesa, com va dir l'Odette, la incertesa dins de la certesa (en relació amb un article sobre els biomarcadors en el procés diagnòstic). Podria tornar-vos a avorrir amb la definició, expectatives, *vida y milagros*, del meu futur, però per sort, encara no està escrit. Caldrà que agafem les nostres millors intencions i

comencem a escriure'l des del maleït full en blanc, com quan has de plasmar tota la feina feta, en un article de 5000 paraules. Sort que per al futur, no existeixen els límits.

“La ignorància genera confiança més sovint que el coneixement: són els que saben poc, no els que en saben molt, els qui afirmen tan positivament que aquest o aquell problema mai no serà resolt per la ciència.”

Charles Darwin

Per a tu, petita gran revolució.

Índex

Abreviatures	2
I. Introducció.....	8
1. El sistema immunitari i la resposta immunitària	10
1.1. La resposta innata	11
1.2. La resposta adaptativa	13
2. La tolerància i la resposta autoimmunitària	13
2.1. La tolerància central	14
2.2. La tolerància perifèrica	16
3. La resposta i la malaltia autoimmunitària	16
3.1. Criteris diagnòstics i criteris de classificació	19
4. Lupus Eritematos Sistèmic	20
4.1. Criteris de classificació	21
4.2. Afectacions clíniques més importants	22
4.3. Nefritis lúpica.....	23
5. Esclerosi Sistèmica.....	25
5.1. Criteris de classificació	27
5.2. Afectacions clíniques més importants	28
5.3. Associació amb les diferents manifestacions clíniques	30
6. Artritis Reumatoide	34
6.1. Criteris de classificació	36
6.2. Afectacions clíniques més importants	37
7. Malaltia Pulmonar Intersticial Difusa.....	38
8. La resposta immunitària de les mucoses.....	40
9. Biomarcadors en les malalties autoimmunitàries	43
9.1. Tipus de biomarcadors	43
9.2. Propietats dels biomarcadors	44
9.2.1. El punt de tall	44
9.2.2. Sensibilitat i especificitat.....	46
9.2.3. Valors predictius positiu i negatiu	47
9.2.4. Raons de versemblança	47
9.3. Aplicabilitat dels biomarcadors en les malalties autoimmunitàries	49
9.3.1. Biomarcadors diagnòstics i pacients seronegatius.....	49

9.3.2. Biomarcadors pronòstics i d'activitat.....	51
9.3.3. Biomarcadors de resposta al tractament	52
9.4. Més enllà dels autoanticossos.....	53
II. Hipòtesi	56
1. Hipòtesi de la tesi	58
III. Objectius	60
1. Generals.....	62
2. Específics.....	62
IV. Materials i mètodes	64
1. Estudi 1: Lupus eritematós sistèmic	66
2. Estudi 2: Esclerosi sistèmica	70
3. Estudi 3: Artritis reumatoide	71
4. Anàlisi estadística	73
V. Resultats.....	76
1. Estudi 1: Lupus eritematós sistèmic	78
2. Estudi 2: Esclerosi sistèmica	84
3. Estudi 3: Artritis reumatoide	90
VI. Discussió.....	100
1. Lupus eritematós sistèmic.....	102
2. Esclerosi sistèmica	105
3. Artritis reumatoide.....	108
4. Projectes de futur	111
VII. Conclusions	116
VIII. Bibliografia	122
IX. Annex: Articles publicats	148
1. Publicació 1.....	150
2. Publicació 2.....	166
3. Publicació 3.....	176

INTRODUCCIÓ

HIPÒTESIS

OBJECTIUS

MATERIALS I MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

ANNEX

Abreviatures

A

ACA	Autoanticossos anti-centròmer
ACPA	Autoanticossos anti-pèptids/proteïnes citrul·linats
ACR	American College of Rheumatology
aFL	Autoanticossos anti-fosfolípids
ANCA	Autoanticossos anti-citoplasma de neutròfil
APRIL	Lligand que indueix la proliferació de limfòcits B (de l'anglès <i>A Proliferation Inducing Ligand</i>)
AR	Artritis Reumatoide
ATA	Autoanticossos anti-topoisomerasa 1

B

BAFF	Factor d'activació de limfòcits B
BCR	Receptor de cèl·lules B
BICD2	Proteïna homòloga bicaudal D 2
BILAG	<i>British Isles Lupus Assessment Group Index</i>

C

CEP-1	Proteïna α -enolasa-1 citrul·linada
CCL	Lligand de quimiocines amb motiu CC
CXCL	Quimiocines amb motius CXC
CXCR	Receptors de quimiocines amb motius CXC

D

DAMP	Patrons moleculars associats a dany
-------------	-------------------------------------

DAS28-VSG *Disease Activity Score 28*, tenint en compte la VSG

DlCo Capacitat de difusió del monòxid de carboni

DNA Àcid desoxiribonucleic

dsDNA DNA de doble cadena

E

ES Esclerosi Sistèmica

EULAR *European League Against Rheumatology*

EUSTAR *European Scleroderma Trials & Research Group*

F

FOXP3 Gen *forkhead box P3*

FPI Fibrosi pulmonar idiopàtica

FR Factor reumatoidal

FVC Capacitat vital forçada

H

HAP Hipertensió arterial pulmonar

HLA Antigen leucocitari d'histocompatibilitat (de l'anglès *Human Leucocyte Antigen*)

HR Ràtio de risc (de l'anglès *Hazard Ratio*)

I

IECA Inhibidors de l'enzim convertiu de l'angiotensina

IFN Interferó

Ig Immunoglobulina

IIP Pneumònies intersticials idiopàtiques

ICAM Molècula d'adhesió endotelial

IMC	Índex de massa corporal
ISN	Societat Internacional de Nefrologia

K

KL-6	<i>Krebs von den Lungen 6</i>
-------------	-------------------------------

L

LES	Lupus eritematos sistèmic
------------	---------------------------

M

MA	Malaltia autoimmunitària
MALT	Teixit limfoide associat amb les mucoses
MMP	Metal·loproteïnasa de la matriu
MPID	Malaltia pulmonar intersticial difusa

N

NET	Trampes extracel·lulars de neutròfils
NIH	Institut Nacional de Salut dels Estats Units
NINE	Pneumònia intersticial no específica
NIU	Pneumònia intersticial usual
NK	Cèl·lula citocida natural (de l'anglès <i>Natural Killer</i>)
NL	Nefritis lúpica

O

OR	Oportunitat relativa (de l'anglès <i>Odds Ratio</i>)
-----------	---

P

PAMP	Patrons moleculars associats a patògens
PBMC	Cèl·lula mononucleada de sang perifèrica (de l'anglès <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PDGFR	Receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes

R

RA33	Proteïna A2 del complex ribonucleoproteic heteronuclear (hnRNP-A2)
RAG	Gen activador de la recombinació
RAI	Resposta autoimmunitària
RELESSER	Registre de pacients amb LES de la Societat Espanyola de Reumatologia
RESCLE	Registre de pacients amb ES de la Societat Espanyola de Medicina Interna
RI	Resposta immunitària
RP3	RNA polimerasa III
RPMI	Medi <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPS	Societat de Patologia Renal dels Estats Units

S

SI	Sistema immunitari
sIgA	Immunoglobulina A secretòria
SLEDAI-2K	<i>SLE Disease Activity Index</i> 2000
Sm	Smith (antigen)
SP-D	Proteïna D del surfactant

T

TCar	Tomografia computada d'alta resolució
TCR	Receptor de cèl·lules T
Th17	Cèl·lules T productores d'IL-17
Thf	Cèl·lules T col·laboradores fol·liculars
TNF	Factor de necrosi tumoral
TLR	Receptor <i>toll-like</i>

U

U1-RNP	Ribonucleoproteïna 1
U3-RNP	Ribonucleoproteïna 3

V

VCAM	Molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars
VPN	Valor predictiu negatiu
VPP	Valor predictiu positiu
VSG	Velocitat de sedimentació globular



I. Introducció

1. El sistema immunitari i la resposta immunitària

El **sistema immunitari** (SI) és el responsable de la defensa del cos humà contra agents patògens i substàncies estranyes. Aquest sistema és extremadament complex i està altament regulat. El conformen cèl·lules, teixits i molècules que funcionen de manera coordinada en xarxa per identificar, neutralitzar i eliminar potencials amenaces, com poden ser bacteris, virus, cèl·lules canceroses o infectades, entre altres, mantenint així la integritat i l'equilibri de l'organisme. La seva funció és essencial per a la supervivència i la salut.

La **resposta immunitària** (RI) inclou el conjunt de processos que el SI activa per a protegir l'organisme dels agents, externs o interns, potencialment nocius. La seva principal característica és la tolerància envers el que és propi. Es classifica en dos tipus principals: la immunitat innata i la immunitat adaptativa o adquirida, que operen de forma coordinada per a garantir la protecció efectiva de l'organisme. La **immunitat innata** constitueix la primera línia de defensa, proporciona una resposta immediata i poc o gens específica davant d'una àmplia gamma de patògens. Inclou barreres físiques i cèl·lules especialitzades que actuen de manera ràpida i relativament indiscriminada. D'altra banda, la **immunitat adaptativa** és més lenta, es desenvolupa envers determinats components específics (per això s'anomena antigen específica) i té la capacitat de memòria. Això li permet respondre d'una manera més efectiva durant una posterior exposició als mateixos components antigènics.

Tot i que la seva principal funció és la defensa en contra dels patògens, el SI també està implicat en l'homeòstasi, l'equilibri salut-malaltia i en molts altres processos vitals dels éssers humans com ara l'embaràs o la reparació tissular. Aquests processos estan modulats per una gran varietat de factors entre els quals trobem els genètics, els ambientals i els mecanismes de control de la RI (1,2). Pel que fa als **factors genètics**, aquests engloben, entre d'altres, les modificacions dels gens que codifiquen les proteïnes que participen en la RI. Els primers que es van identificar són els gens que codifiquen les immunoglobulines (Ig), l'antigen leucocitari d'histocompatibilitat (HLA) i el receptor de cèl·lules T (TCR). En relació amb els **factors ambientals**, diverses publicacions demostren que les infeccions,

les exposicions a substàncies tòxiques, orgàniques o inorgàniques, entre d'altres, poden modular la capacitat de tolerància i conferir un increment del risc de malaltia autoimmunitària (MA), que és aquella que es dona quan es perd la tolerància immunitària. Els **mecanismes de regulació de la RI** són molt diversos i engloben el control de l'activació de les cèl·lules del SI (a través de les cèl·lules reguladores), l'homeòstasi del microambient (modificant l'equilibri de citocines pro i antiinflamatòries) i la regulació de l'expressió de marcadors de superfície de les cèl·lules del SI, entre d'altres (1,3).

1.1. La resposta innata

Tal com ja hem dit abans, la **resposta innata** no és antigen específica i és la que s'activa en primer lloc, de forma ràpida i potent. De fet, pot ser tan efectiva que, per exemple, els invertebrats només disposen d'un SI innat per a la seva defensa. Les principals cèl·lules efectores de la resposta innata són els neutròfils, els macròfags i les cèl·lules citocides naturals o, en anglès, *natural killer* (NK). Les barreres físiques (epitelis) i químiques (enzims), que eviten l'accés del patògen a l'interior del cos, i els mecanismes de detecció, senyalització i eliminació dels que disposen aquestes cèl·lules (receptors toll-like (TLR), receptors NK, citocines, quimiocines i sistema del complement) formen part d'aquesta resposta innata. La seva activació rau en la detecció de patògens externs a través dels receptors TLR, que reconeixen patrons moleculars associats a patògens (PAMP) i patrons moleculars associats a dany (DAMP), i dels receptors NK que, per exemple, detecten l'absència de l'HLA propi (2,3).

Els neutròfils i altres tipus cel·lulars com els eosinòfils i els mastòcits, disposen d'un mecanisme de mort cel·lular programada especial anomenat **netosi** (4). Mitjançant aquest mecanisme, aquestes cèl·lules alliberen material nuclear a l'espai extracel·lular que es coneix amb el nom de trampes extracel·lulars de neutròfils (NET). Aquesta malla de DNA conté histones i proteïnes antimicrobianes entre moltes altres proteïnes i té la capacitat d'immobilitzar patògens per facilitar-ne l'eliminació, molt útil quan no és possible la fagocitosi (5).

En la resposta innata i adaptativa, el **sistema del complement** té un paper rellevant en la defensa de l'organisme i en la regulació de la RI. Aquest sistema del complement està format per un conjunt de proteïnes solubles (que s'activen per escissió i/o unió) i proteïnes de membrana cel·lular que interactuen per dur a terme les diverses funcions immunitàries que té (3). El sistema del complement es pot activar a través de tres vies: la via clàssica, la via alternativa i la via de les lectines (2). La **via clàssica** és considerada la més rellevant en la patogènia de les MA i s'activa quan el C1q s'uneix als complexos antigen-anticòs. La unió de C1q als **immunocomplexos**, provoca l'activació de C2 i de C4 (que s'escindeixen en C2a i C2b, i en C4a i C4b, respectivament). La convertasa C3 (composta per C4b unit a C2a) provoca l'escissió del C3 en C3b i C3a. Després de l'activació del C3, la formació del **complex d'atac a membrana** segueix una via única i compartida que inclou les proteïnes de la C5 fins a la C9. La via clàssica i la de les lectines convergeixen en el pas de C4 a C4b i C4a, mentre que la via alternativa convergeix amb la clàssica en el pas de C3 a C3a i C3b (1–3,6,7). Un cop activat, el sistema del complement té diverses funcions. Mitjançant un procés anomenat opsonització i a través de la unió de C3b a la membrana, la superfície de patògens i cèl·lules queda assenyalada per a la seva fagocitosi. La formació de complexos d'atac a la membrana, que en alguns casos provoquen la lisi cel·lular, és destacable en la defensa contra bacteris. A més, l'activació del complement promou un **ambient proinflamatori** propici per a la RI i l'eliminació dels patògens. Les proteïnes derivades de l'activació del complement, com ara C3a i C5a, actuen com a mediadores químiques que augmenten la permeabilitat dels vasos sanguinis i atrauen cèl·lules del SI (6,7). L'activació del complement també inclou una **funció reguladora** de la RI que en limita una activació excessiva i el dany als teixits sans. A més, proteïnes reguladores, com ara el factor H i el factor I, ajuden a prevenir una activació inapropiada del complement en contra de les cèl·lules pròpies. El complement també participa en el manteniment de l'homeòstasi mitjançant l'eliminació de cèl·lules del cos que estan malmeses o han mort, fet que redueix l'exposició d'antígens propis a les cèl·lules del SI (6,7). L'estudi dels **nivells de C3 i C4**, així com de l'**activitat (CH50)**, dona informació sobre el grau i la via d'activació del sistema del complement i és una eina útil en el diagnòstic i seguiment d'aquests pacients.

1.2. La resposta adaptativa

En els vertebrats, les respostes innata i adaptativa funcionen de forma integrada, ja que la resposta innata participa en l'activació de la resposta adaptativa i els mecanismes de la RI intervenen en l'eliminació dels patògens (3). La **resposta adaptativa** és diversa, específica, té memòria i inclou la immunitat cel·lular i la humoral. La **immunitat cel·lular** es fonamenta en l'acció dels limfòcits T citotòxics antigen específics, que actuen mitjançant el reconeixement de la presentació de pèptids de l'antigen diana a la superfície del patogen, i els limfòcits T col·laboradors, que donen suport a l'activació d'altres limfòcits amb la mateixa especificitat antigènica a través d'interaccions cèl·lula-cèl·lula i amb l'ajuda de citocines. L'activació d'aquests limfòcits T depèn de la presentació dels antígens per part de les cèl·lules presentadores d'antigen. La **resposta humoral**, en canvi, està mediada pels limfòcits B que actuen contra el patogen amb la producció i secreció d'anticossos antigen específics, l'activació del complement i d'altres mecanismes cel·lulars com la fagocitosi o la citotoxicitat, que en faciliten l'eliminació. La seva activació pot ser dependent o independent dels limfòcits T col·laboradors (2).

2. La tolerància i la resposta autoimmunitària

Els mecanismes del SI funcionen coordinadament per a protegir l'hoste enfront del perill evitant la reactivitat enfront d'antígens propis (autoantígens), un fenomen anomenat **tolerància immunitària**. Aquesta tolerància es pot estendre a antígens ambientals innocus o a antígens fetals. Malgrat això, la capacitat de control de la tolerància no és absoluta i, en determinades circumstàncies, es poden iniciar RI dirigides envers antígens propis anomenades **respostes autoimmunitàries** (RAI). Diversos mecanismes intervenen en la limitació de l'autoreactivitat dels limfòcits. Si aquest mecanisme té lloc al timus (limfòcits T) o al moll de l'os (limfòcits B) i afecta els limfòcits en via de maduració, s'anomena **tolerància central** i si es duu a terme a la resta del cos o a la perifèria i afecta els limfòcits madurs, s'anomena **tolerància perifèrica**.

2.1. La tolerància central

Durant la maduració dels **limfòcits T** en el timus, hi intervenen dos processos de selecció successius. Primer, la **selecció positiva** o supervivència limitada als limfòcits capaços de reconèixer les molècules HLA del propi individu. Després, la **selecció negativa** o eliminació dels limfòcits que reconeixen pèptids derivats de proteïnes pròpies presentats per l'HLA propi amb alta afinitat. Per tant, només acaben de madurar aquells limfòcits que reconeixen complexos HLA-pèptid amb baixa afinitat i, en conseqüència, tenen la capacitat potencial de reconèixer una molècula d'HLA pròpia carregada amb un pèptid no propi (3). Malgrat això, alguns limfòcits que reconeguin antígens propis amb una afinitat mitjana-alta podran esdevenir cèl·lules T reguladores que tenen importància en la tolerància perifèrica (8–10). Aproximadament un 5% dels limfòcits T acabarà madurant i passarà a la circulació mentre la resta s'eliminarà per apoptosi (3). En aquest procés hi intervé el gen *AIRE* (*AutoImmune REgulator*), que codifica un factor de transcripció que permet l'expressió d'una gran quantitat de proteïnes pròpies a les cèl·lules presentadores d'antigen del timus durant la maduració dels limfòcits T (11) (**Figura 1**).

Pel que fa a la maduració dels **limfòcits B**, al moll de l'os hi té lloc un procés de **selecció negativa**, on aquells limfòcits amb un receptor de cèl·lules B (BCR) capaç de reconèixer proteïnes pròpies són eliminats o inactivats. A diferència dels limfòcits T, els limfòcits B tenen la capacitat de tornar a recombinar les cadenes del BCR per obtenir-ne un amb una nova especificitat i tornar a passar pel procés de selecció (**Figura 1**) (2,12).

Un cop els limfòcits B madurs passen a la perifèria, participen en la RI als fol·licles limfoides on maduren l'afinitat del seu BCR mitjançant un procés conegut com a **hipermutació somàtica**. En les primeres etapes de la maduració de l'afinitat dels limfòcits B, dins dels fol·licles limfoides, l'activació de les cèl·lules B depèn de la cooperació amb les cèl·lules T. En funció de la intensitat del senyal del BCR, de la integració dels senyals coestimuladors de les cèl·lules pròximes i de les molècules que conformin el microambient, es desenvolupen dos tipus de **cèl·lules productores d'anticossos**, les de vida curta, detectables en sang perifèrica, i les de vida llarga, residents al moll de l'os. Les de vida curta són les que presenten una afinitat més alta pel seu

antigen i migren fora dels centres germinals. La migració extrafol·licular necessita l'expressió de molècules d'adhesió i s'incrementa amb la senyalització via TLR9 i l'exposició a IL-12 (13).

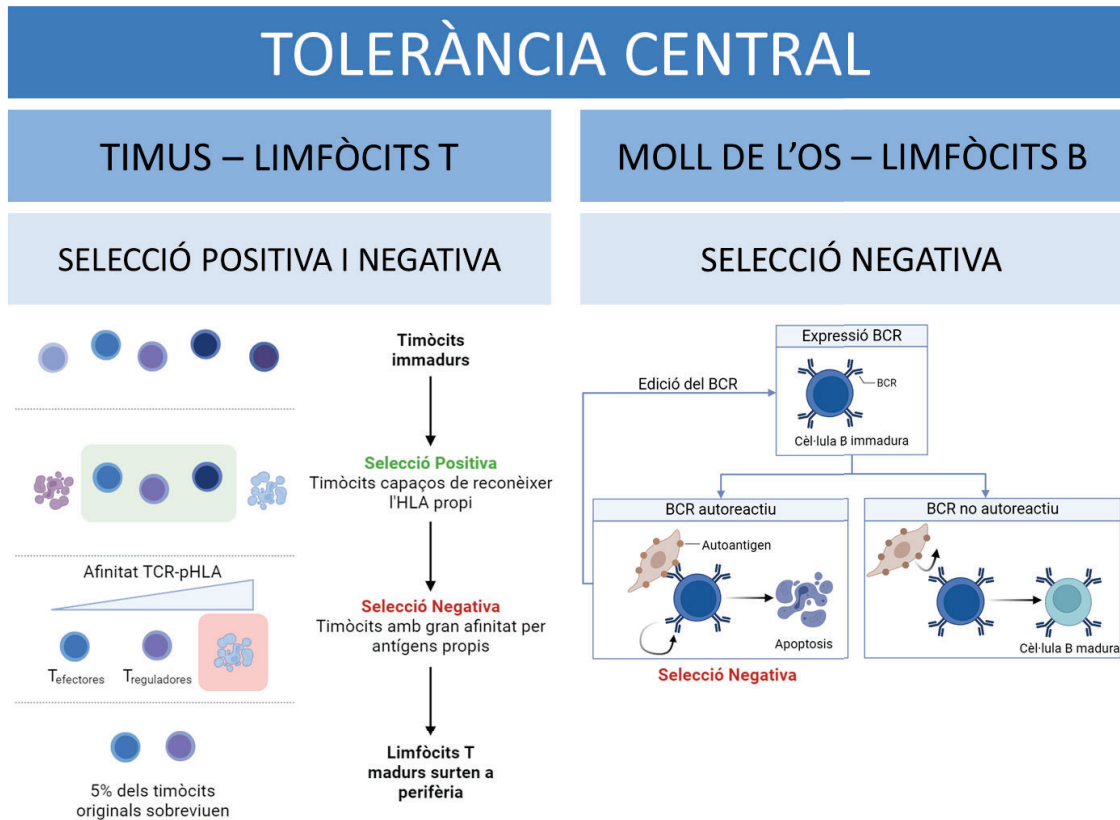


Figura 1. Procés de tolerància central. Els processos de maduració dels limfòcits T i B es duen a terme al timus i al moll de l'os, respectivament, amb l'objectiu de limitar l'autoreactivitat del receptor de cèl·lules T (TCR) i el de cèl·lules B (BCR). Creat amb BioRender.com

Aquests **limfòcits B de vida curta** productors d'anticossos extrafol·liculars, no pateixen grans hipermutacions somàtiques del seu BCR, depenen dels factors de supervivència BAFF i APRIL, sobreviuen uns 3 o 4 dies i són els encarregats de la producció d'anticossos inicial en una RI (14). El BCR de les **cèl·lules B de vida llarga** tenen una afinitat menor pel seu antigen. En aquest subtipus cel·lular es redueix l'expressió de molècules d'adhesió i tendeixen a entrar dins dels centres germinals on té lloc la millora de la seva afinitat mitjançant la hipermutació somàtica del seu BCR. A continuació, la reducció en l'expressió del CXCR5 (receptor que les manté als fol·licles) i l'augment de l'expressió de BCMA (un receptor de BAFF i APRIL) i

de CXCR4 (el receptor més important del CXCL12), promou la migració d'aquests plasmoblasts al moll de l'os. Allà, la presència d'un microambient adequat fa que aquests plasmoblasts madurin a **cèl·lules plasmàtiques**, que tenen una gran capacitat de supervivència, fins a desenes d'anys, i de producció d'anticossos (15).

Malgrat tot, els mecanismes de selecció centrals no poden evitar que una part dels limfòcits T i B autoreactius migrin a la perifèria i, en major o menor proporció, siguin un perill potencial (16). En el moment que aquests limfòcits interaccionin amb els seus antígens, els mecanismes de tolerància perifèrica seran els responsables d'evitar que s'activin.

2.2. La tolerància perifèrica

L'objectiu de la **tolerància perifèrica** és el d'evitar l'activació dels limfòcits madurs autoreactius que han escapat dels mecanismes de tolerància central, per protegir l'individu de fenòmens d'autoimmunitat nocius. Els mecanismes de la tolerància perifèrica actuen als òrgans limfoides secundaris (ganglis limfàtics i melsa) o als teixits on s'expressa l'autoantigen implicat. Un dels mecanismes més importants és la **inducció d'anergia** cel·lular, que es produeix quan hi ha reconeixement antigènic en absència de senyal coestimulador, o un senyal d'una cèl·lula T reguladora amb la mateixa especificitat, i el limfòcit no s'activa (10). Les cèl·lules autoreactives també poden patir un procés de tolerització i transformar-se en **cèl·lules reguladores**, o bé ser eliminades per apoptosi (1–3). Aquests mecanismes afecten principalment els limfòcits T, però també als limfòcits B, ja que en molts casos necessiten l'ajuda d'una cèl·lula T col·laboradora per activar-se. Per tant, la funcionalitat del limfòcit B es veu limitada per la tolerització del limfòcit T (17).

3. La resposta i la malaltia autoimmunitària

La **disfunció de la tolerància** central o perifèrica provoca que es puguin activar algunes **RAI** envers antígens propis (11). Quan es dona aquesta activació sense produir dany i, per tant, repercussió clínica, parlem

de RAI (amb presència d'**autoanticossos** o d'activació de **limfòcits autoreactius**). Només parlem de MA a partir del moment en què es produeix el dany tissular o l'aparició de manifestacions clíniques pròpies de la MA.

Les **MA** són malalties cròniques que afecten, en conjunt, a una proporció significativa (7-10%) de la població mundial (18). A banda d'algunes excepcions, les MA són més freqüents en **dones** que en homes, fet que ha incentivat nombrosos estudis sobre la influència de les hormones sexuals i les alteracions del cromosoma X, entre d'altres (19). Cal tenir en compte que no sempre resulta senzill determinar si una patologia és d'origen autoimmunitari o no. Els postulats de Rose i Witebsky (20) revisats l'any 1993 per Rose i Bona (21) encara són vigents i indiquen que per considerar que una malaltia és de causa autoimmunitària ha de complir determinades evidències. Aquestes es classifiquen en directes, indirectes o circumstancials: per exemple, si són transmissibles mitjançant la inoculació dels autoanticossos o les cèl·lules T autoreactives d'un altre individu, si es pot reproduir la malaltia en models animals mitjançant autoanticossos, cèl·lules T, modificació genètica o immunització directa amb l'autoantigen, si en un mateix individu es manifesten diferents malalties considerades autoimmunitàries, si hi ha resposta clínica al tractament immunosupressor, o si trobem infiltració limfocitària dels òrgans afectats, entre d'altres (21).

La **divisió clàssica de les MA**, segons els òrgans i teixits afectats, s'ha fet en dos grans grups; les MA focalitzades en un òrgan concret (**MA òrgan específiques**) i les MA amb afectació sistèmica de l'organisme (**MA sistèmiques**). En els darrers anys, però, s'ha posat en relleu que les fronteres entre aquests dos grups no semblen tan clares i són controvertides.

L'**etiologia de les MA** és desconeguda i són considerades malalties multifactorials (22). S'han descrit **factors genètics i ambientals de susceptibilitat (Figura 2)**. En relació amb els factors genètics, polimorfismes en els gens que codifiquen TLR com el *TLR9* o el *TLR7* (19,23,24), encarregats d'iniciar la resposta a partir de la detecció de DNA o RNA bacterià i víric, s'han associat a un increment del risc de patir una MA, especialment el lupus eritematós sistèmic (LES). A més, el fet que el gen que codifica el TLR7 es trobi en el cromosoma X reforça que les dones tinguin una susceptibilitat genètica major en disposar de dues còpies del gen

(19,25). D'altra banda, mutacions en els gens de les proteïnes implicades en el sistema del complement o en altres gens que afecten la resposta adaptativa com, per exemple, en els gens activadors de la recombinació (*RAG*) o en el gen forkhead box P3 (*FOXP3*) associat a la funció T reguladora, també poden augmentar el risc de patir una malaltia de l'espectre que engloba des de les immunodeficiències més greus fins a les MA (26–28). Finalment, l'expressió d'alguns HLA específics, concretament al·lels de l'HLA-DRB1 (epítot compartit) en el cas de l'artritis reumatoide (AR) (29,30), s'ha associat a un increment del risc de patir una MA. En relació amb els factors ambientals, el sexe femení, el tabaquisme, el microbioma i l'exposició a substàncies químiques també s'han associat a una major incidència de MA.



Figura 2. Factors de risc de les malalties autoimmunitàries. Les malalties autoimmunitàries es consideren malalties multifactorials. Els principals factors de risc poden classificar-se en factors genètics i ambientals. Creat amb BioRender.com

Un dels models utilitzats per explicar la **patogènia de les MA**, tenint en compte que sovint evolucionen en forma de brots successius, es divideix en quatre fases. En primer lloc, la **fase de susceptibilitat**, que implica la presència de factors que augmenten el risc de perdre la tolerància envers elements propis. En segon lloc, la **fase d'inici**, en què es detecta una RAI (presència de limfòcits T o B autoreactius o d'autoanticossos) sense conseqüències clíniques. La tercera fase, o **fase de propagació**, on es detecta dany orgànic o l'expressió de manifestacions clíniques pròpies de la MA. En últim lloc, la quarta fase, o **fase de regulació o resolució**, és aquella on disminueix o desapareix l'expressió clínica existent durant un temps, gràcies a l'actuació de vies immunoreguladores o de l'administració de fàrmacs. Malauradament, aquesta regulació per mitjà de vies inhibidores és, habitualment, transitòria i provoca que aquestes malalties tinguin una evolució en forma de brots recurrents o, fins i tot, en progressió constant (**Figura 3**) (11).

3.1. Criteris de classificació i diagnòstics

Per avançar en la recerca de les MA és imprescindible treballar amb poblacions de pacients definides pels mateixos paràmetres per tal de garantir la possibilitat de comparar-ne els resultats i les conclusions. Per tant, és necessari fer servir criteris classificatoris. Els **criteris de classificació** són criteris estrictes que s'utilitzen per estandarditzar la inclusió de pacients en assajos clínics o estudis de recerca. En canvi, els **criteris diagnòstics** són aquells que s'apliquen en la pràctica clínica habitual amb l'objectiu de diagnosticar i poder tractar als pacients, i acostumen a ser menys estrictes. En el moment del diagnòstic, no tots els pacients compliran els criteris classificatoris de la MA corresponent. Però, al cap d'un temps d'evolució de la malaltia, el més probable és que una proporció important els acabin complint (31).

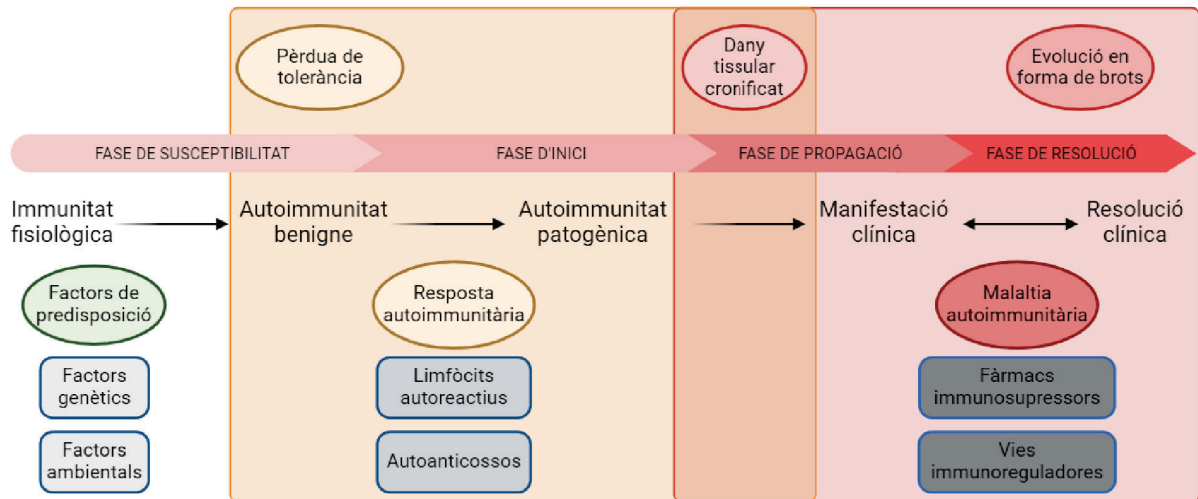


Figura 3. Evolució des de la immunitat fisiològica a la malaltia autoimmunitària.

Hi ha diferents factors genètics i ambientals que incrementen el risc de patir una malaltia autoimmunitària. Si té lloc una pèrdua de tolerància envers antígens propis, es pot detectar una resposta autoimmunitària amb presència de limfòcits autoreactius o d'autoanticossos. Quan aquesta resposta provoca dany orgànic és quan parlem de malaltia autoimmunitària. En aquest moment apareixen les manifestacions clíniques pròpies de la malaltia. Per últim, l'acció de les vies immunoreguladores o dels fàrmacs immunosupressors permeten, de vegades, el control clínic de les manifestacions, però no la curació de la malaltia que sol tenir una evolució en forma de brots. Creat amb BioRender.com

4. Lupus Eritematós Sistèmic

El **LES** és una MA sistèmica caracteritzada per la presència de **brots recurrents** que poden afectar a diversos òrgans i on el dany orgànic es va acumulant (32). La **pèrdua de tolerància** enfront d'antígens propis i la desregulació de les respostes innata i adaptativa provoca un increment de la producció de citocines proinflamàtores, autoanticossos i dipòsit d'immunocomplexos que, finalment, causen la lesió orgànica característica del LES (32).

La **prevalença del LES** varia segons la població d'estudi de 20 a 200 casos per cada 100.000 habitants. És més freqüent en dones que en homes (ràtio 5-9:1) i entre dues i tres vegades més prevalent en individus de raça negra (33). Els pacients tenen un **increment del risc de mortalitat**, de 2 a 5 vegades, respecte del de la població general i aquesta mortalitat es distribueix de manera bimodal (més marcat en etapes inicials de la malaltia per infeccions oportunistes o per la pròpia activitat de la malaltia i, en etapes

avançades, a causa de problemes cardiovasculars o de fallada orgànica pel dany acumulat). Per tant, la **identificació precoç dels brots** és fonamental per a la prevenció i el control de la malaltia, així com per a la millora del pronòstic d'aquests pacients.

La **patogènia del LES** encara és poc coneguda, però s'han identificat diferents factors de susceptibilitat (22). L'expressió de gens associats a la susceptibilitat de patir LES és més elevada en limfòcits B i cèl·lules dendrítiques que en altres tipus cel·lulars implicats en la RAI (22,34). Això reforça la rellevància que tenen aquestes cèl·lules en la patogènia del LES i, en particular, dona suport al paper dels **autoanticossos**, sobretot els anti-DNA de doble cadena (dsDNA). També s'han associat al LES, gens que codifiquen proteïnes implicades en l'eliminació de les restes apoptòtiques (22). Aquest fet reforça que una alteració en l'apoptosi associada a causes genètiques podria facilitar la presentació d'antígens, com és el cas del fenomen dels NET, i l'exposició d'antígens com el DNA, a les cèl·lules del SI, afavorint així la RAI (35,36). S'ha vist que els gens que codifiquen proteïnes involucrades en les vies de senyalització dels **interferons (IFN) de tipus I**, principalment IFN- α i IFN- β , estan sobreexpressats en pacients amb LES (22,37). Malgrat això, en alguns estudis amb models animals, la reducció dels nivells d'IFN provoca l'empitjorament de la malaltia. Això fa que es consideri que l'efecte de l'IFN, tant en la immunitat innata com en l'adaptativa, és complex i pot tenir un efecte dual proinflamatori o antiinflamatori (24). Pel que fa a la susceptibilitat més alta en dones, diversos estudis mostren el paper dels **estrògens** en el desenvolupament de la malaltia (38,39).

4.1. Criteris de classificació

Des que es van publicar els primers criteris classificatoris del LES el 1982, han anat evolucionant (40). A la darrera revisió de l'American College of Rheumatology (ACR) i el European League Against Rheumatic Diseases (EULAR) de l'any 2019 (41), s'hi inclou un **sistema de puntuació** que valora les afectacions clíniques i immunitàries dels pacients. Aquests criteris consten de **7 dominis clínics** (constitucional, hematològic, neuropsiquiàtric, mucocutani, serós, musculoesquelètic i renal) i **3 dominis immunitaris** (la

desregulació del sistema del complement (C3 i C4), els autoanticossos anti-fosfolípids (aFL) (l'anticoagulant lúpic i els autoanticossos anti-cardiolipina i anti-beta-2-glicoproteïna 1) i autoanticossos específics de LES, on s'inclouen els anti-dsDNA i els anti-Smith [Sm]) (41). A més, els pacients han d'haver presentat autoanticossos anti-nuclears detectats per immunofluorescència indirecta en algun moment, com a **criteri d'entrada** imprescindible. La classificació d'un pacient requereix el criteri d'entrada i 10 punts amb, com a mínim, 1 criteri clínic. La sensibilitat i l'especificitat dels criteris de classificació són del 95-98% i 96-99%, respectivament, ja que oscil·len segons si la cohort a estudi inclou pacients en el moment del diagnòstic o amb una evolució més llarga de la malaltia (**Taula 1, pàgina 42**).

4.2. Afectacions clíniques més importants

L'expressió clínica del LES es caracteritza per ser **multiorgànica** en cada pacient i heterogènia entre els pacients (**Figura 4**). La majoria de les afectacions que es presenten són de tipus constitucional i engloben la fatiga, el malestar i la febrícula. Les afectacions musculoesquelètica, mucocutània, gastrointestinal, renal, cardíaca i hematològica són les que tenen una prevalença més alta (42). L'afectació **musculoesquelètica**, bàsicament en forma d'artràlgies i miàlgies, és la primera simptomatologia de la malaltia en el 60-70% dels pacients i, al cap de 5 anys del diagnòstic de LES, n'afecta fins al 85% (43). L'afectació **mucocutània** és heterogènia, i principalment de caràcter agut en forma d'eritema malar. L'afectació **gastrointestinal**, que sovint pot anar associada a certs fàrmacs o infeccions, afecta fins al 75% dels pacients i engloba des de l'aparició d'úlceres orals i dolor abdominal fins a casos de peritonitis. La nefritis lúpica (NL), és l'afectació **renal** més característica i greu. Té una prevalença d'entre el 50-75% i s'acompanya d'activitat serològica (títols elevats d'autoanticossos anti-dsDNA i/o consum del complement) (22,44-46). Quant a l'afectació de les membranes seroses, la pericarditis és la principal causa de l'afectació **cardíaca** i també n'és una de les primeres causes de mortalitat (44). El risc de patir infart de miocardi a causa de malaltia coronària és 50 vegades més alt en els pacients de LES comparat amb individus sans del mateix sexe i edat (47). La pleuritis simptomàtica afecta el 50% dels pacients amb LES i aquest percentatge puja

fins al 90% quan es consideren els casos asimptomàtics (pleuritis detectada a l'autòpsia) (44,48). En l'àmbit **hematològic**, les hematocitopènies són freqüents, però la seva prevalença varia en funció de la cohort a estudi. Les més comunes són la leucopènia i la trombocitopènia i el mecanisme patogènic que les origina ha estat àmpliament associat a la presència d'autoanticossos (49-51).

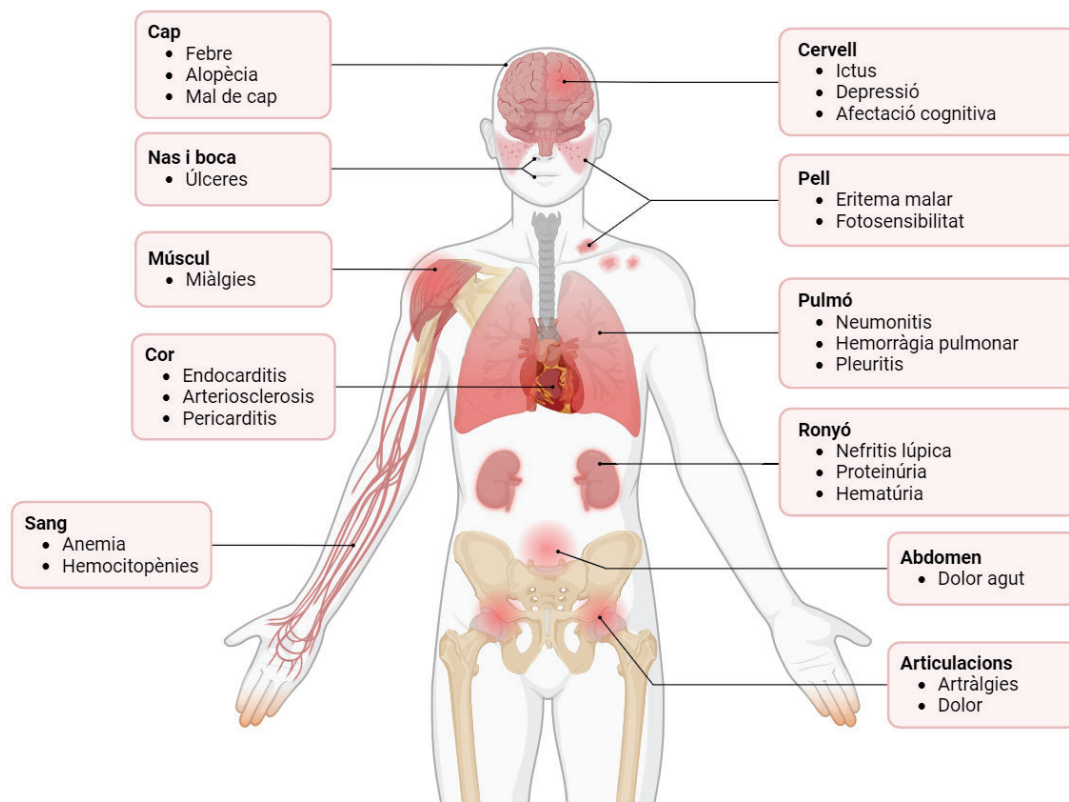


Figura 4. Manifestacions clíniques del lupus eritematos sistèmic agrupades per zona o òrgan afectat. El lupus eritematos sistèmic és una malaltia autoimmunitària que té una afectació multiorgànica i heterogenia entre pacients. Creat amb BioRender.com

4.3. Nefritis lúpica

En el moment del diagnòstic de LES, un 25-50% dels pacients tenen signes o símptomes de malaltia renal, per això, la **NL** requereix una menció especial. La NL és un tipus de **glomerulonefritis** i és la primera causa de morbimortalitat dels pacients amb LES (45,46,52,53). Afecta clínicament un

5-20% dels pacients amb LES al llarg dels primers 10 anys després del diagnòstic (45,54,55), però afectarà, amb l'aparició de símptomes de NL, fins a un 60% dels pacients, en algun moment de la malaltia (45,46,52,53). La prevalença de NL és més alta en pacients joves, de sexe masculí i d'ètnia llatina, africana o asiàtica, en comparació amb pacients caucàsics (46,56).

Els **factors de risc** de la NL són gairebé els mateixos que els del LES i, per això, és complicat conèixer el pronòstic renal de cada pacient. En la **patogènia de la NL**, hi participen diversos tipus cel·lulars, però hi destaquen els **limfòcits B**, els **limfòcits T cooperadors productors d'IL-17 (Th17)** i els **limfòcits T cooperadors fol·liculars (Thf)**. Els Thf són els encarregats d'activar els limfòcits B en els centres germinals (22,57,58). Aquests tipus cel·lulars promouen la producció d'autoanticossos i de diferents mediadors solubles com citocines, quimiocines, factors de creixement, IFN tipus I, BAFF i IL-17 (59,60). El dipòsit d'**immunocomplexos** intrarenalment i l'activació del **complement** s'associen a la NL (**Figura 5**) (22,61,62). Tant els limfòcits B de llarga vida residents a la medul·la òssia (cèl·lules plasmàtiques), com els limfòcits B productors d'autoanticossos de curta vida que es troben en circulació, s'han associat a la NL (63-66).

El LES i la NL es caracteritzen per l'acumulació d'autoanticossos. Més enllà dels anti-dsDNA podem trobar autoanticossos aFL, anti-ribonucleoproteïna-1 (U1-RNP) i autoanticossos anti-citoplasma de neutròfil (ANCA). Els anti-U1-RNP s'associen a la NL proliferativa, els ANCA amb la NL ràpidament progressiva i els aFL poden ser causa de la microangiopatia trombòtica renal (22,34,67,68).

Actualment, la **biòpsia renal** és la tècnica de referència per definir la tipologia de la NL i pot detectar la NL silent o asimptomàtica (69). En els criteris classificatoris del LES de l'any 2019, una biòpsia que evidenciï una NL proliferativa de classe III o V i la presència d'autoanticossos anti-nuclears, són suficients per a la classificació del pacient (41). L'actual classificació histològica de la NL es va definir l'any 2003 i es compon de **dos índexs**: el d'**activitat** (que puntua de 0 a 24 troballes histològiques associades a l'activitat de la NL) i el de **cronicitat** (que puntua de 0 a 12 troballes relacionades amb el dany tissular cronificat). Una major puntuació s'associa a un pitjor pronòstic renal (70). Tot i que aporta informació important, la

biòpsia renal és una tècnica invasiva, per això, la recerca de marcadors sèrics o urinaris que puguin limitar la necessitat de la biòpsia renal per a la presa de decisions terapèutiques és un camp en contínua evolució.

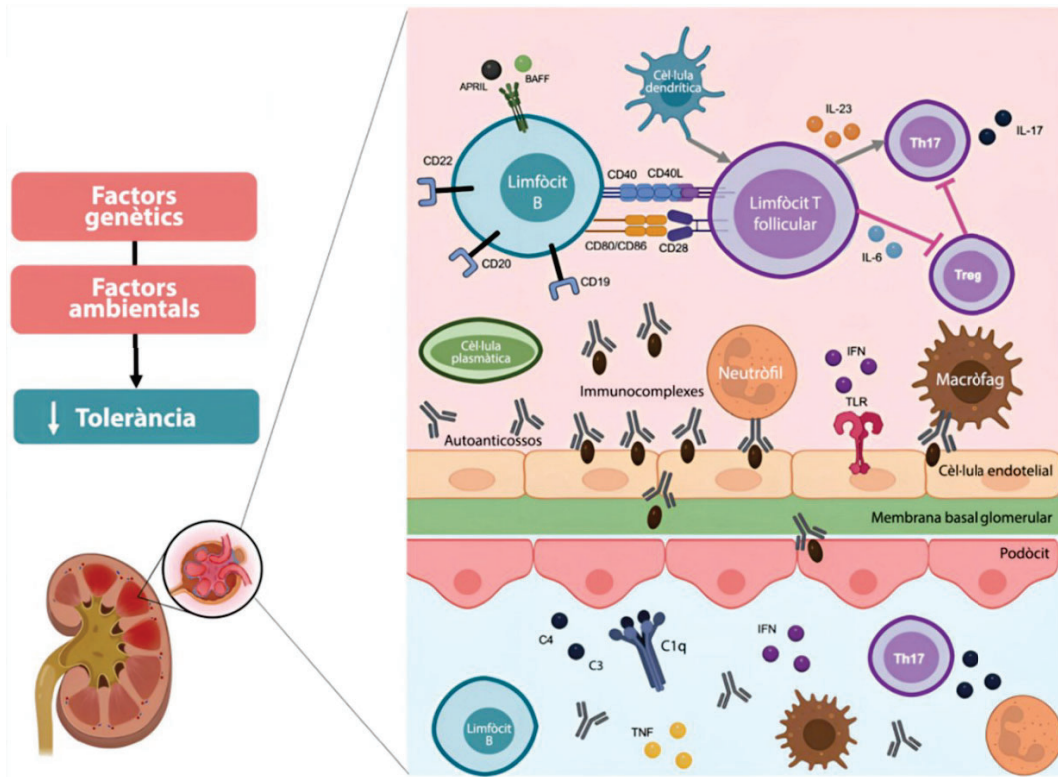


Figura 5. Patogènia de la nefritis lúpica. La nefritis lúpica és la complicació orgànica més greu del lupus eritematos sistèmic. La coincidència de factors genètics i ambientals, entre d'altres, causa la pèrdua de tolerància envers alguns autoantígens. El principal mecanisme patogènic al ronyó és el dipòsit d'immunocomplexos que activen el sistema del complement i afecta tant els podòcits com les cèl·lules endotelials i la membrana basal glomerular. Els neutròfils i els macròfags són les principals cèl·lules efectores del dany orgànic. Les principals citocines són els interferons i el factor de necrosi tumoral (TNF), a banda de la IL-23, la IL-17 i la IL-6. La participació dels limfòcits T fol·liculars i dels limfòcits Th17, així com dels limfòcits B i les cèl·lules plasmàtiques, és fonamental. Adaptada de (62) amb BioRender.com.

5. Esclerosi Sistèmica

L'**esclerosi sistèmica (ES)** és una MA que es caracteritza per alteracions vasculars i una producció excessiva de teixit connectiu que produeix fibrosi, que afecta estructuralment i funcionalment a diversos òrgans (71–73). La seva **prevalença** és d'entre 50 i 300 casos per milió d'habitants (73). L'ES afecta entre 4 i 9 vegades més a les dones que als

homes i sol aparèixer entre els 40 i els 60 anys (71,73). Presenta una **taxa de mortalitat** de fins al 25% en els primers 5 anys d'evolució. Fins a un 20% dels pacients amb ES poden presentar formes de la malaltia que superposen amb d'altres MA, com la miositis, el LES o la síndrome de Sjögren. A més, els pacients de raça negra tenen un risc més elevat de patir una malaltia ràpida i generalitzada i tenen un pitjor pronòstic (73,74).

La **patogènesi de l'ES** és poc coneguda, però també és una MA multifactorial. En les primeres fases, es troben infiltrats cel·lulars en diversos òrgans, sobretot al voltant dels vasos sanguinis. En fases més avançades aquests infiltrats són més escassos i d'una fase inflamatòria es passa a una fase fibròtica. Els canvis fibròtics són més comuns a la pell, als pulmons, al tracte gastrointestinal, al cor i a l'aparell musculoesquelètic (**Figura 6**) (71–73,75,76).

Clàssicament, a partir dels estudis de LeRoy i Medsger (77), es va utilitzar l'**afectació cutània** per a classificar els pacients en 2 grups principals: aquells amb una afectació limitada i aquells amb una afectació difusa. L'**ES limitada** es defineix per una afectació cutània limitada a les mans, els avantbraços i la cara, amb una evolució més lenta de la malaltia i, en general, menys afectació d'òrgans interns. L'**ES difusa** es caracteritza per una afectació cutània que afecta tot el cos, un curs de la malaltia més greu i una evolució més ràpida. A banda, hi ha un altre grup de pacients que tenen fenomen de Raynaud i símptomes sistèmics d'ES sense afectació cutània, es tracta de l'**ES sine scleroderma**. Posteriorment a aquestes definicions, es van identificar uns autoanticossos que estaven molt associats al fenotip cutani dels pacients. Els autoanticossos anti-centròmer/CENP-B (**ACA**) estan presents en la majoria dels pacients amb ES limitada i els autoanticossos anti-topoisomerasa I/Scl70 (**ATA**) es troben principalment en pacients amb ES difusa (78). Més tard, s'han identificat els autoanticossos anti-RNA polimerasa III (**RP3**) que s'associen a l'ES difusa i la crisi renal esclerodèrmica, una complicació greu que afecta fins al 25% dels pacients amb RP3 (72). A diferència del LES, on els pacients es caracteritzen per expressar simultàniament diferents autoanticossos, els pacients amb ES acostumen a presentar una única especificitat antigènica i, per això, es diu que els autoanticossos associats a l'ES són **mútuament excloents** (79).

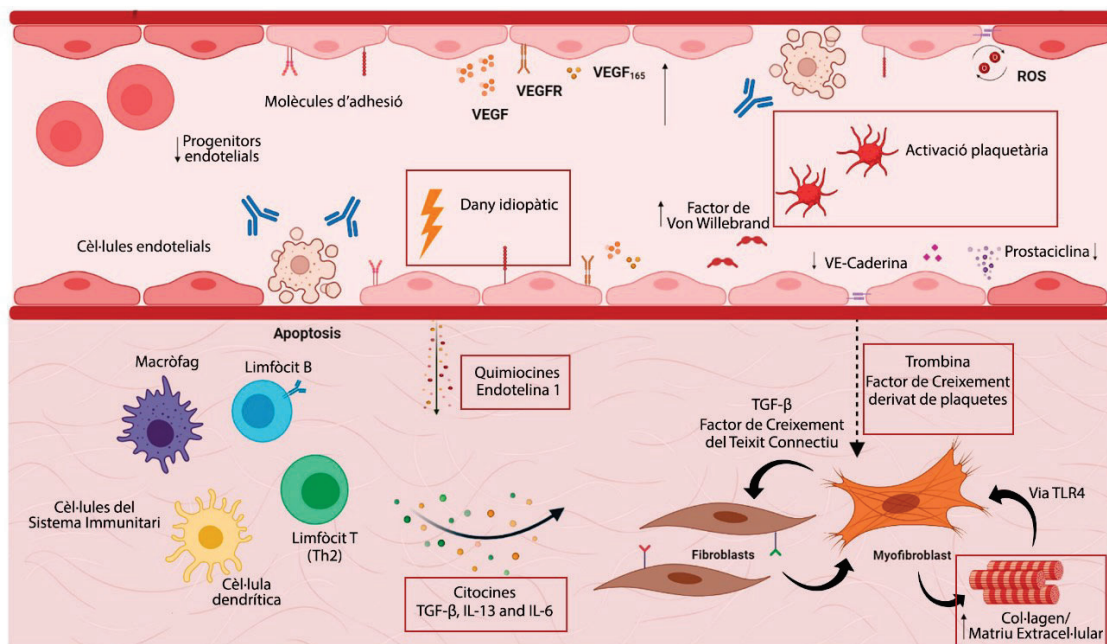


Figura 6. Patogènia de l'esclerosi sistèmica. L'inici de la patogènia es creu que pot tenir un origen en el dany de la microvasculatura. Aquest dany provoca un estat inflamatori que promou l'activació plaquetària, la reducció de les molècules d'adhesió i l'augment dels factors de coagulació, entre d'altres. Això augmenta la permeabilitat dels vasos i l'extravasació de quimiocines, endotelina, trombina i factors de creixement que recluten cèl·lules del sistema immunitari com els limfòcits B i T, els macròfags o les cèl·lules dendrítiques, i afavoreixen el manteniment d'un ambient inflamatori. Tots aquests factors contribueixen a la transformació dels fibroblasts en miofibroblasts i al dipòsit excessiu de col·lagen i matriu extracel·lular que segueix estimulant aquesta transformació a través del sensor TLR4. Aquest dipòsit excessiu de col·lagen i matriu extracel·lular, i per tant la fibrosi a la pell, és la característica clínica principal de la malaltia. Adaptada de (76).

5.1. Criteris de classificació

Els criteris actuals de classificació són els que han redactat conjuntament l'ACR i l'EULAR l'any 2013 (80). Aquests criteris inclouen un **sistema de puntuació** que valora les afectacions clíniques i immunitàries dels pacients. Per tal que un pacient pugui ser classificat, cal que el total sumi un mínim de 9 punts. Els **dominis clínics** són 7 (presència d'escleroderma als dits de les dues mans, afectacions de la pell dels dits, lesions a les puntes dels dits, telangièctasis, alteracions dels capil·lars, afectació pulmonar, fenomen de Raynaud), però només un, el que avalua la presència d'escleroderma als dits de les dues mans és criteri suficient per a la classificació. En canvi, en altres dominis la puntuació va de 2 a 4 punts i només en computa l'ítem que més puntuació atorga en cada un. Pel que fa

al **domini dels autoanticossos**, només els ACA, ATA i RP3 hi estan inclosos amb un màxim de 3 punts. Tot i això, hi ha altres autoanticossos específics d'ES, com ara els anti-Th/To, anti-fibril·larina (U3-RNP), o associats a ES com els anti-Ku, anti-PM/Scl, anti-NOR90, anti-receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGFR) o els anti-Ro52, que es poden considerar d'utilitat per al diagnòstic (**Taula 1, pàgina 42**).

5.2. Afectacions clíniques més importants

Molts signes i símptomes de l'ES són **poc específics** i tenen una alta prevalença en la població general, per exemple, l'afectació musculoesquelètica (rigidesa o dolor), la fatiga o la pèrdua de pes. Malgrat que la presentació clínica de l'ES és molt heterogènia entre pacients, fet que en dificulta i retarda el seu diagnòstic, el **fenomen de Raynaud** acostuma a ser la primera afectació que apareix i la més freqüent en els pacients amb ES (més d'un 90% dels pacients). El **reflux gastroesofàgic**, les **úlceres digitals**, l'**afectació de la vasculatura capil·lar** i la **disfàgia** són altres afectacions característiques i comunes a la malaltia (**Figura 7**) (71,72).

En els pacients amb **ES difusa**, l'afectació cutània usualment apareix poc després del fenomen de Raynaud i, tot i que afecta la major part de la pell del cos, la més greu és la que afecta les zones distals i la cara. La fibrosi de la pell produeix l'aspecte facial típic dels pacients amb ES, amb una obertura bucal disminuïda (**microstomia**), l'aprimament i aparició de línies verticals als llavis, i la pèrdua de l'expressió facial. A més, l'engruiximent de la pell del voltant de les articulacions en limita el moviment i la seva funcionalitat. L'afectació d'òrgans interns és més comuna en l'ES difusa que en l'ES limitada o l'ES *sine scleroderma*. Les afectacions orgàniques principals són als pulmons en forma de **malaltia pulmonar intersticial difusa** (MPID), al sistema cardiorespiratori en forma d'**hipertensió arterial pulmonar** (HAP), al **tracte gastroesofàgic** amb problemes de deglució i motilitat, als ronyons en forma de **crisi renal esclerodèrmica** i als dits en forma d'**úlceres digitals** de repetició que poden comportar l'amputació de les falanges distals (71–73,75). En canvi, en els pacients amb **ES limitada** poden passar anys entre l'aparició del fenomen de Raynaud i l'aparició d'altres afectacions orgàniques. El **tracte gastroesofàgic** i la **musculatura**

són els òrgans més afectats en aquest grup, malgrat que l'afectació pulmonar en forma d'**HAP** i també de **MPID**, pot aparèixer en 1 de cada 5 pacients amb ES limitada (73).

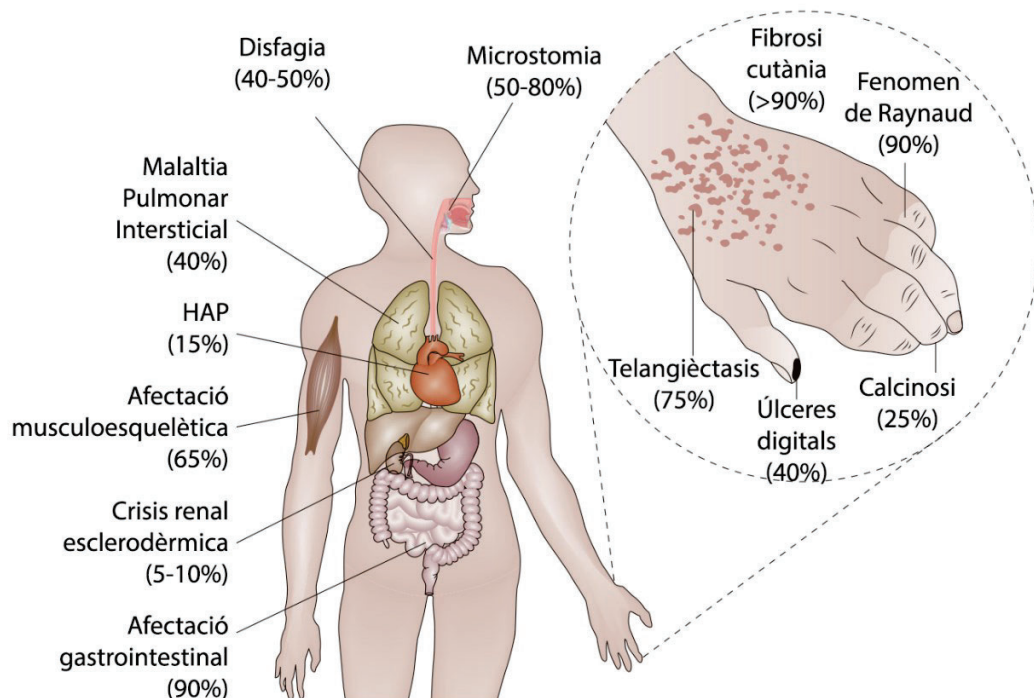


Figura 7. Manifestacions clíniques de l'esclerosi sistèmica. Les manifestacions clíniques més freqüents de l'esclerosi sistèmica afecten la pell, en forma de fibrosi cutània, fenomen de Raynaud i telangièctasis. També es pot observar microstomia, disfàgia, reflux gastroesofàgic i afectació gastrointestinal. Altres manifestacions habituals són l'afectació musculoesquelètica i la malaltia pulmonar intersticial. La darrera és actualment la primera causa de mortalitat en pacients amb esclerosi sistèmica. Adaptada de (71).

Múltiples estudis han descrit l'associació dels ACA amb una ES limitada i un major risc d'HAP i els ATA amb l'ES difusa i un risc incrementat de patir MPID. En canvi, els RP3 s'associen a l'ES difusa, a l'afectació renal i a una major prevalença de neoplàsies (81,82). A banda d'aquestes associacions conegudes, un estudi amb 6927 pacients del registre del European Scleroderma Trials & Research Group (EUSTAR) del 2019, va poder classificar els pacients en 6 grups diferenciats segons l'anàlisi de 24 variables clíniques i serològiques (83), més enllà dels grups clàssics fonamentats en l'afectació cutània (difusa o limitada). Aquests 6 grups diferenciats no eren exclusius d'un fenotip cutani, però tampoc ho eren per al perfil d'autoanticossos.

La **prevalença de la MPID** associada a ES s'acosta al 50% en pacients amb ES difusa i al 35% en pacients amb ES limitada. La mortalitat directament atribuïble a la MPID és del 35%, mentre que l'atribuïda a l'HAP és del 26% (73,84). Gràcies a la introducció dels inhibidors de l'enzim conversiu de l'angiotensina (IECA) en el tractament de la crisi renal esclerodèrmica, actualment, la MPID, ha passat a ser la primera causa de mortalitat en pacients amb ES (85). Tant el trasplantament pulmonar com el renal són bones opcions de tractament, ja que, la supervivència és similar a la de pacients sense ES (73,84).

5.3. Associacions amb les diferents manifestacions clíniques

Malgrat que la classificació dels pacients amb ES s'ha fet a partir de l'**extensió de l'afectació cutània**, s'han cercat associacions de les diferents manifestacions clíniques amb el **perfil d'autoanticossos** i, s'ha vist que, el perfil immunitari també és capaç d'estratificar els pacients en diferents grups.

Si es tenen en compte els fenotips cutanis descrits per Leroy i Medsger (77) i les seves associacions amb els autoanticossos, els **ACA** s'han associat a un fenotip d'**ES limitada** (78,81,82,86). Pel que fa a l'**ES difusa**, la presència d'ACA confereix un risc menor que la presència d'**ATA** o **RP3** (78,81,82,85-90). En algun estudi, la presència d'ATA s'ha associat a una menor prevalença d'ES *sine scleroderma* (91).

Donada l'alta prevalença del fenomen de Raynaud, només s'ha associat en alguna ocasió puntual a la presència d'ACA (78,81). La presència d'ACA confereix protecció envers la **crisi renal esclerodèrmica** i, els **RP3**, un risc major de patir-ne (79,81,82,85,87). En relació amb la **MPID**, la presència d'**ATA** i **RP3** s'ha associat a la presència de MPID i els ACA a la seva absència (78,79,81,82,87-90). La **HAP**, segona causa de mortalitat, s'ha associat a la presència d'**ACA** i a l'absència d'ATA (79,81,82).

La resta de manifestacions clíniques i la seva associació als diferents autoanticossos no és tan clara (78,81,82). Les associacions més importants són la presència de càncer sincrònic amb la presència de RP3 i la presència d'úlceres digitals amb la positivitat d'ATA (79,81,82,90,92).

En resum, els pacients amb ACA tenen un fenotip de la malaltia més lleu, amb menys afectació cutània i orgànica, tot i que tenen un risc més elevat de patir HAP. D'altra banda, els pacients amb ATA o RP3, presenten una afectació cutània difusa, més risc de patir MPID i, en el cas concret dels RP3, una major prevalença de neoplàsies (92,93).

L'any 2006, un estudi amb les dades de l'EUSTAR (82), va comparar les associacions de les diferents manifestacions clíniques de l'ES en funció de, per una banda, el fenotip cutani (ES limitada versus ES difusa) i, de l'altra, el perfil d'autoanticossos (ACA versus ATA). Els resultats d'aquest estudi van posar de manifest que els fenotips cutanis defineixen la presència d'11 manifestacions clíniques i el perfil d'autoanticossos unes altres 15 que no eren 100% coincidents (82). L'any 2012, aquest mateix estudi es va replicar a la cohort de pacients amb ES de la Societat Espanyola de Medicina Interna (RESCLE) amb uns resultats molt similars (78). Si es té en compte el fenotip cutani (ES limitada versus ES difusa), hi ha 13 manifestacions clíniques que s'associen a un dels dos fenotips cutanis. D'altra banda, quan els pacients s'estratifiquen pel seu perfil d'autoanticossos (ACA versus ATA), les manifestacions clíniques associades canvien i se n'identifiquen també 13, algunes coincidents. En aquest estudi del RESCLE, també se cercaven associacions amb l'ES *sine scleroderma* i es va concloure que l'acroosteòlisi (destrucció de les falanges distals dels dits de mans i peus) era menys prevalent en l'ES *sine scleroderma* que en l'ES difusa o limitada. La síndrome seca era també menys freqüent malgrat que l'afectació cardíaca era més prevalent en l'ES *sine scleroderma* en comparació amb les altres formes cutànies (78). Un recent estudi en la cohort EUSTAR ha identificat les manifestacions clíniques associades a l'ES *sine scleroderma* (94). Manifestacions clíniques diverses (telangièctasis, úlceres digitals, artritis, miositis, afectació gastroesofàgica i HAP) són menys freqüents en aquests pacients quan es comparen amb pacients amb fenotip cutani difús i limitat. Aquests resultats reforcen l'estatus de l'ES *sine scleroderma* com a una forma més lleu de la malaltia (94). Finalment, un estudi amb la cohort del RESCLE l'any 2022, ha publicat els factors de risc per al càncer en pacients amb ES (95). Només la presència d'autoanticossos (ATA, RP3 i PM/Scl, però no d'ACA) s'ha associat a una major prevalença de càncer. En les anàlisis multivariants, només la presència d'ACA ha esdevingut un factor protector

envers el càncer, tot i que en l'estratificació per tipus de neoplàsies, la presència d'ATA i anti-Ro s'ha associat a un risc elevat de patir càncer de pulmó (n=29) i de mama (n=47), respectivament (95).

Tot i la generalització en funció del fenotip cutani o del perfil d'autoanticossos i les associacions ja descrites (**Figura 8**), encara **manquen biomarcadors** que defineixin i **estratifiquin millor els pacients** amb ES. Una part d'aquesta estratificació, sobretot referent a les síndromes de superposició amb les miositis, s'ha solucionat parcialment amb la inclusió d'altres autoanticossos relacionats amb l'ES, com per exemple, el PM/Scl, l'U1-RNP, el Th/To i l'U3-RNP, entre d'altres.

Tanmateix, falten biomarcadors que aportin informació sobre el **risc** i el **pronòstic** dels pacients amb ES en funció del seu perfil d'autoanticossos.

 ES <i>sine</i> scleroderma	 ES limitada	 ES difusa		 ACA	 ATA	 RP3
↓	↓	↑	Artritis	↓	↑	↑
↓	↓	↑	Miositis	↓	↑	↑
↓	↓	↑	Úlceres digitals	↑	↑	↓
—	↑	↓	Raynaud	—	—	—
↓	↓	↑	Afectació esofàgica	↓	↑	↑
—	↓	↑	Afectació intestinal	—	—	—
↓	↓	↑	MPID	↓	↑	↑
↓	↑	↓	HAP	↑	↓	—
↓	↓	↑	Afectació cardíaca	↓	↑	↓
—	↓	↑	Afectació renal	↓	↑	↑
—	—	—	Síndrome seca	↓	↑	↓
—	↓	↑	Capil·laroscòpia anormal	—	—	—
↓	↑	↑	Telangièctasis	↑	—	—
—	—	—	Calcinosis	↑	↓	↓
—	—	—	Neoplàsia	↓	—	↑

Figura 8. Manifestacions clíniques en l'esclerosi sistèmica i les seves associacions. Els pacients amb esclerosi sistèmica s'han agrupat històricament segons el fenotip cutani: esclerosi sistèmica *sine scleroderma*, limitada o difusa (esquerra) o segons els tres autoanticossos inclosos en els criteris classificatoris: ACA, ATA o RP3 (dreta). Malgrat que es coneixen associacions clares entre el fenotip cutani i el perfil d'autoanticossos, les manifestacions clíniques que s'associen al fenotip cutani, no sempre coincideixen amb les que s'associen al perfil d'autoanticossos. Les fletxes vermelles indiquen una prevalença més alta d'aquella manifestació clínica en el grup de pacients i les fletxes verdes, una prevalença més baixa. Els guions grisos indiquen manca d'associació o d'informació. HAP: Hipertensió arterial pulmonar, MPID: Malaltia pulmonar intersticial difusa.

6. Artritis Reumatoide

L'**AR** és la MA sistèmica més prevalent (entre un 0.5-1% en població adulta). Es caracteritza per una **inflamació crònica** de predomini articular i la **presència d'autoanticossos** anti-pèptids/proteïnes citrul·linats (ACPA) i del factor reumatoidal (FR) (96). La inflamació articular de l'AR és en forma de poliartritis crònica que s'acompanya de la destrucció i deformitat articulars, ocasionant una marcada discapacitat i pèrdua de la qualitat de vida. Malgrat que la presència d'autoanticossos n'és una característica important, un **30% dels pacients** no en tenen i s'anomenen **seronegatius** (97-100). En dones, la prevalença és de 2 a 4 vegades superior que en homes. Aquest biaix de gènere s'atribueix a diferents factors com l'efecte d'algunes hormones, l'embaràs o factors genètics, entre d'altres (96). L'AR presenta una **mortalitat** d'un 40-50% més elevada que en la població general i la primera causa n'és la **MPID** (101-103).

Els **factors de risc** més determinants de l'AR són el **tabaquisme**, el **sexe femení** i l'epítot compartit de l'HLA. La immunosenescència també s'ha proposat com a un factor de risc que implica l'increment de l'estrès oxidatiu, l'augment de la reactivitat a antígens propis amb modificacions post-traduccionals, l'augment de la susceptibilitat a patògens, limitacions de les poblacions limfocitàries naïf i l'escurçament telomèric (104). A més, s'ha descrit que la infecció per *Porphyromonas gingivalis* té la capacitat de generar proteïnes **pròpies citrul·linades**, afavorint una RI envers aquestes proteïnes (105). Aquesta mateixa RI pot reconèixer, per mimetisme molecular, els pèptids citrul·linats humans, per exemple l'α-enolasa, i generar autoanticossos (CEP-1). L'expressió d'alguns al·lels d'HLA-DRB1, que comparteixen una seqüència d'aminoàcids específica (**epítot compartit**), pot ser la responsable del 35-40% del risc genètic de patir AR (29,30). A més, la presència d'alguns d'aquests al·lels s'ha associat també a una AR amb presència d'ACPA (29). Això ha motivat l'aparició de dos models que expliquen aquesta associació, el primer defensa que aquests al·lels són capaços de presentar específicament els pèptids "patogènics" i generar una RAI, l'altre model, defensa que la presència d'aquests al·lels podria seleccionar cèl·lules T autoreactives durant el procés de maduració tímica (104,106).

La **patogènia** de la malaltia encara és poc coneguda. Tot i això, se sap que la producció d'ACPA, detectable anys abans del debut de la malaltia, augmenta el risc de desenvolupar AR en individus amb altres factors de risc. La inflamació articular, causada per una RAI, provoca una **activació permanent de l'endoteli microvascular** que permet el transvasament de leucòcits fins a la membrana sinovial (96). En el 40-50% dels pacients que tenen infiltrat limfocitari a la membrana sinovial, s'hi poden arribar a observar estructures fol·liculars organitzades que recorden les dels centres germinals. En aquestes estructures s'hi han identificat zones que contenen limfòcits B en proliferació i en procés de maduració de l'afinitat, i d'altres que contenen cèl·lules T (**Figura 9**) (107). El repertori de l'especificitat dels receptors d'aquests limfòcits T, és coincident entre articulacions del mateix pacient, però difereix del repertori d'altres pacients (108). La permanència d'aquest **ambient inflamatori** a la membrana sinovial pot estar promoguda per la presència continuada d'autoantígens. La diferenciació de cèl·lules dendrítiques fol·liculars i l'expressió autònoma de citocines (IL1 α i TNF- α) i quimiocines proinflamatòries, afavoreixen l'augment de la presentació antigènica. Tot això suggereix que hi ha una producció *in situ* d'**autoanticossos patogènics**. A més, la desregulació del procés de netosi i l'augment en la **producció de NET** faciliten la presentació d'antígens propis citrul·linats al SI i tenen implicacions en la resposta inflamatòria de l'AR. Aquesta producció de NET provoca la **producció d'IFN- α** per part de les cèl·lules dendrítiques i tanca el cercle viciós afavorint la producció d'autoanticossos (5,109,110).

Els immunoassajos disponibles al mercat per a la **detecció d'ACPA** mostren una sensibilitat de fins al 80% i una especificitat >95% per al diagnòstic d'AR. La detecció d'ACPA anys abans de l'inici de la malaltia (en la fase preclínica) suggereix que la maduració de l'afinitat d'aquests autoanticossos es duu a terme abans de l'inici dels símptomes de l'AR (111). Encara que la base molecular responsable de l'inici del **procés de citrul·linació** és poc coneguda, les dades de pacients fumadors en comparació amb pacients no fumadors, mostren una major presència de citrul·linació en les proteïnes de la rentada broncoalveolar dels individus fumadors. Aquest fet dona suport a la hipòtesi que, el primer procés de citrul·linació pot començar al pulmó i acabar desenvolupant la RAI a la

membrana sinovial en individus susceptibles de patir AR (112). A banda de tot aquest procés inflamatori persistent, la disrupció de l'**homeòstasi en la formació i la resorció òssia** té també un paper rellevant en la patogènia. Alguns estudis han demostrat la capacitat dels ACPA de promoure la proliferació d'osteoclasts, encarregats de la resorció òssia, de manera independent al propi procés inflamatori (113).

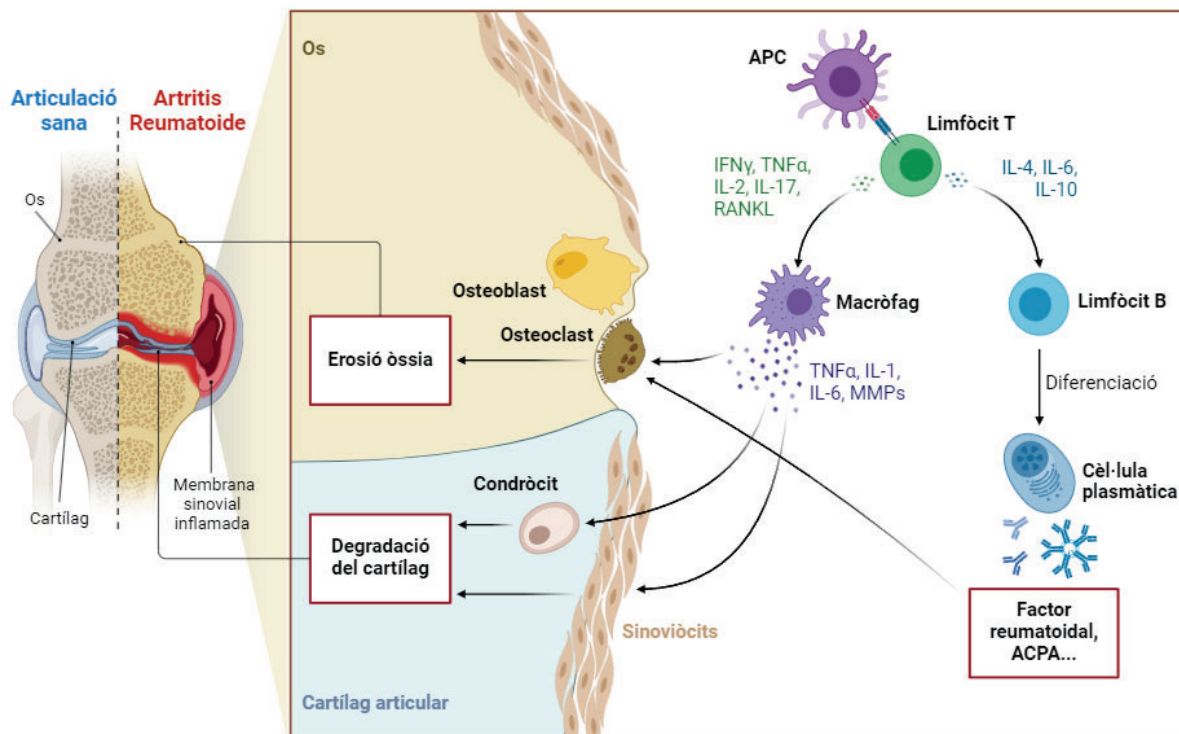


Figura 9. Patogènia de l'artritis reumatoide. El procés de citrul·linació de les proteïnes i el desenvolupament d'una resposta autoimmunitària envers aquestes modificacions produeix l'activació dels macròfags, dels monòcits i dels neutròfils, i la producció de citocines proinflamatòries. Aquest ambient inflamatori afecta els sinoviòcits i condrocits de la membrana sinovial i provoca la degradació del cartílag articular. A la vegada, també altera l'equilibri entre l'activitat dels osteoblasts i els osteoclasts afavorint l'erosió òssia. S'ha vist a més, que els autoanticossos també poden alterar aquest equilibri de manera independent. Creat amb BioRender.com

6.1. Criteris de classificació

Els criteris de classificació vigents de l'AR van ser publicats conjuntament per l'ACR i l'EULAR l'any 2010 (114). Es basen en una **escala de puntuació**, on cada ítem suma un determinat nombre de punts fins a un màxim de 10. A partir de 6 punts el pacient ja és classificat com a AR. El fet

que el pacient tingui almenys una articulació amb sinovitis clara és el criteri imprescindible d'entrada. Els ítems de puntuació s'agrupen en **4 dominis**: el primer domini puntua el nombre i tipus d'articulacions afectades, el segon la presència i el títol dels autoanticossos inclosos (ACPA i FR), el tercer els reactants de fase aguda presents (velocitat de sedimentació globular (VSG) o proteïna C reactiva) i l'últim, la durada de l'afectació articular (**Taula 1, pàgina 42**). Malgrat la inclusió del FR i dels ACPA, fins a un 30% dels pacients poden ser negatius per als dos marcadors, en funció de si es tracta d'un diagnòstic recent o d'una AR de curta o llarga evolució (115). Tot i això, aquests criteris, en pacients amb AR incipient, tenen una sensibilitat d'entre el 84-90% i una especificitat del 20-71%, segons amb quin estàndard es compari, però són útils per al diagnòstic precoç (116,117).

6.2. Afectacions clíniques més importants

El debut de la malaltia és insidiós en el 70% dels pacients, un 10% debuten de manera aguda, en setmanes, i el 20% restant de manera subaguda, en mesos o pocs anys (96). L'**afectació articular** inicial més freqüent és simètrica i afecta principalment els canells, les articulacions metacarpofalàngiques, interfalàngiques proximals de les mans o metatarsofalàngiques dels peus. L'artritis és l'afectació més freqüent en l'AR, però les **afectacions extra-articulars** també són habituals. La **MPID** és l'afectació extra-articular més freqüent, la que afecta de forma determinant la qualitat de vida i la supervivència dels pacients i, com ja s'ha dit, la primera causa de mortalitat (118). La MPID associada a l'AR s'assembla més a la fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI), que no pas a la MPID associada a altres MA, pel patró radiològic i el pitjor pronòstic. La **síndrome seca** és una afectació extra-articular que afecta fins a un 40% dels pacients (119,120) i que comporta el diagnòstic de **síndrome de Sjögren** addicional en un 30% dels pacients amb AR evolucionada (121,122). D'altra banda, tant l'aparició de **nòduls reumatoidals** com d'**afectacions oculars** (escleritis o epiescleritis), afecten al voltant d'un 25% i un 5% dels pacients amb AR, respectivament (122).

7. Malaltia Pulmonar Intersticial Difusa

La MPID és un **grup heterogeni d'afectacions del parènquima pulmonar**, que es caracteritza per la **inflamació** o la **fibrosi** de l'espai intersticial i que interfereix en l'intercanvi de gasos. Aquesta afectació pot causar **difficultat respiratòria** i, fins i tot, insuficiència respiratòria i la mort (123,124). La MPID es pot classificar en idiopàtica o de causa coneguda. En aquest segon grup, hi ha la MPID associada a MA, l'associada a exposicions (ambientals, ocupacionals o fàrmacs) i la sarcoïdosi, entre d'altres (125). El **diagnòstic** i la **classificació** de la MPID es basa en la combinació de dades clíniques, radiològiques, serològiques i, sovint, també anatomopatològiques (124,126). La **prevalença de la MPID** varia des de 4 a 80 casos per cada 100.000 habitants a Europa i Estats Units (127). Pel que fa a la MPID associada a MA, la prevalença depèn de la MA de base. En el **LES**, la prevalença és baixa, **d'entre el 4-10%**, en l'**ES** és al voltant del **50%** (84,128), tot i que hi ha estudis on arriba fins al 90% (129,130) i a l'**AR** s'aproxima al **12-15%** (128), però en estudis de població mediterrània es troba gairebé en el 20% dels pacients (102). Pel que fa al debut clínic, la MPID pot ser la primera manifestació clínic de la MA, pot debutar en pacients amb una MA de llarg recorregut, o bé, els dos diagnòstics poden ser simultanis (131-133).

El **procés inflamatori** característic de la MPID produeix una **acumulació de teixit connectiu** i causa **fibrosi irreversible** a l'interstici pulmonar (134). És una de les principals causes de morbidimortalitat de les MA (135,136). No existeix una classificació radiològica o histopatològica pròpia de la MPID associada a MA i, per tant, se segueix la classificació de les pneumònies intersticials idiopàtiques (IIP) (126). Encara que el patró de **pneumònia intersticial usual (NIU)** és el més habitual en les IIP (134), en les MPID associades a MA el patró més prevalent és el de **pneumònia intersticial no específica (NINE)** (128,137) amb l'excepció de l'AR, on la prevalença de la NIU i la de la NINE són similars (128,138,139). La presència d'un o d'un altre patró radiològic s'associa al pronòstic del pacient, essent el patró de NIU el que té un pitjor pronòstic, independentment de la malaltia de base (140-142). Les exacerbacions agudes de la MPID empitjoren el pronòstic i tenen una mortalitat associada de >50% (143,144). La MPID associada a MA té una incidència estimada anual d'exacerbacions agudes de

prop del 6%, en canvi, la MPID associada a AR té una incidència de prop del 12%, que s'assimila al 20% d'incidència d'exacerbació de la FPI (142,143,145). Això consolida el fet que la MPID associada a AR, sobretot amb patró NIU, té un comportament i un pronòstic similar al de la FPI (144,146) **(Taula 1, pàgina 42)**.

L'etiologia de la MPID és encara desconeguda i el seu inici i desenvolupament imprevisible (131). Els pulmons estan exposats a l'ambient extern. Un individu adult respira uns 8000 L d'aire al dia, que interactuen amb uns 75 m² d'epiteli alveolar. Aquest aire conté micropartícules, oxidants i/o contaminants, i microorganismes que poden produir lesions a l'estructura de l'epiteli alveolar. Per això, el pulmó està protegit per components clau tant del SI innat com de l'adaptatiu (123). Arran d'un procés de reparació tissular, hi ha un augment de la permeabilitat vascular que permet el reclutament i l'extravasació de cèl·lules (monòcits, limfòcits, fibròcits...) (147). Aquest procés es converteix en aberrant quan l'activació de cèl·lules encarregades de la reparació tissular, sobretot de macròfags M2 i limfòcits Th2, es perpetua i hi ha una producció de matriu extracel·lular que retroalimenta el procés fibròtic de cicatrització. En aquesta reparació aberrant hi tenen gran importància les citocines TGF- β , IL-17, IL-13, IL-6, IL-4, a més de l'endotelina 1 i diferents proteïnes que promouen la coagulació, com la trombina (136,148). Certs polimorfismes, com els del promotor de la mucina 5 (149–151), incrementen el risc d'una resposta reparadora aberrant **(Figura 10)**.

A banda de l'estudi d'aquest procés, s'han descrit molècules que s'associen amb el dany alveolar derivat de la fibrosi pulmonar, com ara el *Krebs von den Lungen 6* (KL-6), que ha demostrat una clara associació amb la MPID associada a AR, però també a d'altres MA (152–164), algunes proteïnes del surfactant com la SP-D i algunes quimiocines (153,156,157,160).

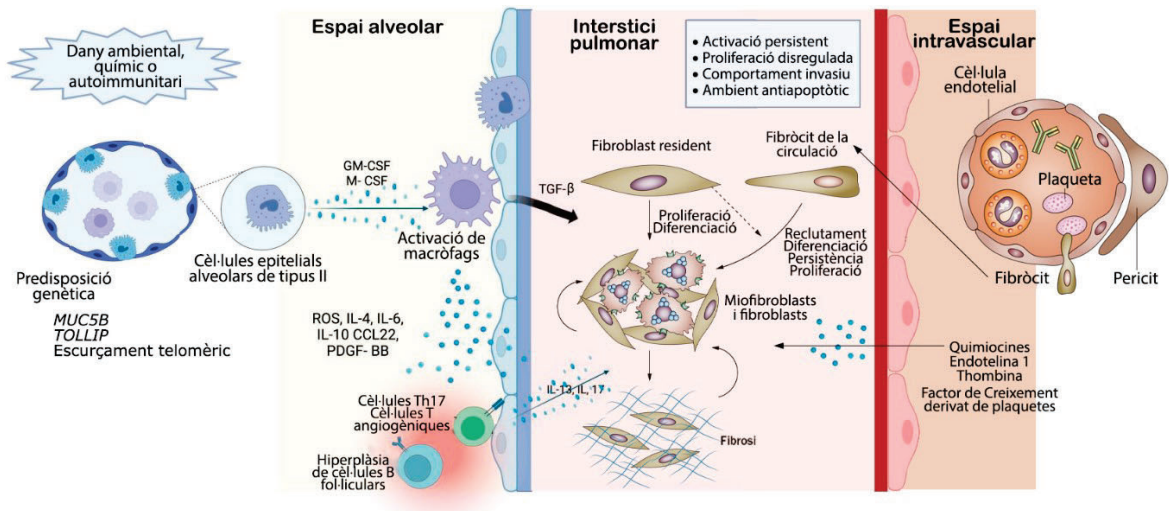


Figura 10. Patogènia de la malaltia pulmonar intersticial difusa.

Determinades agressions (ambientals, químiques o autoimmunitàries) a l'espai alveolar de pacients amb predisposicions genètiques, poden activar processos de reparació que comporten l'activació dels macròfags de tipus M2 i dels limfòcits Th2. Quan aquesta activació es perpetua, la proliferació dels fibrocits (residents o reclutats de la circulació) es veu alterada i es promou un ambient anti-apoptòtic que provoca l'acumulació de col·lagen i matriu extracel·lular, que limita la funcionalitat del pulmó. Aquesta activació i proliferació de fibroblasts és a causa dels alts nivells de TGF- β que se secreten a partir de l'activació dels macròfags de tipus M2, entre altres motius. Adaptada de (136) i (148).

8. La resposta immunitària de les mucoses

Com ja s'ha dit, l'epiteli és la **primera barrera de defensa** de l'organisme. En el cas de les mucoses, el teixit limfoide associat s'anomena MALT, de l'anglès *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*. La classe d'anticòs més abundant del sistema immunitari de les mucoses és la **immunoglobulina A (IgA)**, produïda per les cèl·lules plasmàtiques de la paret de les mucoses de forma local. Hi ha dos tipus d'IgA humana, la IgA1 i la IgA2 que es diferencien per modificacions en la zona d'unió de les cadenes pesades i pels polisacàrids de la regió N-terminal. A la sang, la IgA es troba de forma monomèrica, és produïda per les cèl·lules plasmàtiques del moll de l'os i la proporció d'IgA1 respecte d'IgA2 és de 10:1. Per contra, a les mucoses, la IgA és dimèrica. Aquest dímer incorpora la cadena J i és transportat a través de l'epiteli, per posteriorment alliberar-se, és el que es coneix amb el nom d'**IgA secretòria (sIgA)** (165). En aquest cas, la proporció d'IgA1 respecte d'IgA2 és, amb algunes excepcions en funció del teixit, de 3:2 (166).

Ja que les IgA tenen la capacitat d'unir-se a la superfície dels patògens i promoure la seva fagocitosi, la citotoxicitat mediada per anticossos, la producció de citocines i espècies reactives d'oxigen, l'estudi de la presència d'IgA amb especificitats relacionades amb MA pot ser de gran interès. Tot i que a la IgA se li atribueixen funcions protectores i no té la capacitat d'activar el complement per la via clàssica, alguns estudis postulen que poden activar la via alternativa del sistema del complement a través de l'agregació de patògens (167–169).

En relació amb el diagnòstic i seguiment de les MA, tot i que l'isotip majoritàriament utilitzat és l'IgG, els autoanticossos d'isotip IgA tenen especial rellevància en la malaltia celíaca (170), la vasculitis IgA (171), i la síndrome antifosfolípídica, on els autoanticossos d'isotip IgA contra la beta-2-glicoproteïna 1 podrien tenir un paper patogènic (172).

Taula 1. Resum de les manifestacions clíniques més freqüents, afectació pulmonar, criteris de classificació i biomarcadors del lupus eritematós sistèmic, l'esclerosi sistèmica i l'artritis reumatoide.

	Lupus Erimatós Sistèmic	Esclerosi Sistèmica	Artritis Reumatoide
Manifestacions clíniques freqüents	Artràlgies Mialgies Eritema malar Hemocitopènies Serositis Nefritis lúpica	Fenòmen de Raynaud Reflux gastroesofàgic Esclerodermia Úlceres digitals Microstomia MPID HAP Crisis renal esclerodèrmica	Artritis Nòduls reumatoides Síndrome de Sjögren secundari Escleritis/episcleritis MPID
Prevalença MPID	Entre el 4-10%	Més del 50% (fins al 90% en alguns estudis)	Entre el 12-15% (fins al 20% en població mediterrània)
Patró radiològic característic	NINE (24%) NIU (8%)	NINE (75%) NIU (20%)	NIU (43%) NINE (38%)
Últims criteris classificatoris	ACR/EULAR 2019	ACR/EULAR 2013	ACR/EULAR 2010
Puntuació per classificar	10	9	6
Manifestacions clíniques incloses als criteris classificatoris	Febre (2 pts) Leucopènia (3 pts) Trombocitopènia (4 pts) Hemòlisi autoimmunitària (4 pts) Deliri (2 pts) Psicosi (3 pts) Convulsions (5 pts) Alopècia (2 pts) Úlceres orals (2 pts) Lupus discoide (4 pts) Lupus cutani (6 pts) Efusió pleural o pericàrdica (5 pts) Pericarditis aguda (6 pts) Artritis o artràlgies (6 pts) Proteinúria (4 pts) Biòpsia renal amb nefritis de classe II o V (8 pts) Biòpsia renal amb nefritis de classe III a IV (10 pts)	Esclerodèrmia als dits de les mans (9 pts) Puffy fingers (2 pts) Esclerodactília (4 pts) Úlceres digitals (2 pts) Pitting scars a les puntes dels dits (3 pts) Telangièctasis (2 pts) Capilaroscòpia anormal (2 pts) HAP (2 pts) MPID (2 pts) Fenòmen de Raynaud (3 pts)	1 gran articulació (0 pts) De 2 a 10 grans articulacions (1 pt) D'1 a 3 articulacions petites (2 pts) De 4 a 10 articulacions petites (3 pts) Més de 10 articulacions amb 1 articulació petita com a mínim (5 pts) FR i ACPA negatius (0 pts) FR o ACPA a títols baixos (2 pts) FR o ACPA a títols alts (3 pts) PCR i VSG normal (0 pts) PCR o VSG elevades (1 pt) Durada dels símptomes menys de 6 setmanes (0 pts) Durada dels símptomes més de 6 setmanes (1 pt)
Autoanticossos inclosos als criteris classificatoris	Anti-dsDNA (6 pts) Anti-Sm (6 pts) Algún anti-fosfolípid (2 pts): Anticoagulant lúpica Anti-beta-2 glicoproteïna I Anti-cardiolipina	Anti-CENP-B (ACA) (3 pts) Anti-Scl70 (ATA) (3 pts) Anti-RP3 (3 pts)	ACPA (0-3 pts) FR (0-3 pts)
Altres autoanticossos (prevalença)	Marcadors: Anti-dsDNA (40-96%) Anti-Sm (5-40%) Anti-Ribosomal P (10-35%) Anti-PCNA (<5%) Anti-nucleosoma (56-90%) Altres: Anti-histona (50-80%) Anti-fosfolípids (40-60%) Anti-IFI16 (26-63%) Anti-Ro60/SS-A (25-60%) Anti-C1q (17-58%) FR (15-35%) Anti-La/SS-B (19-30%) Anti-U1-RNP (13-32%) Anti-Ro52 (20-25%) Anti-RA33 (20-25%) Anti-Ku (2-20%)	Marcadors: Anti-CENP-B (ACA) (12-45%) Anti-Scl70 (ATA) (18-30%) Anti-U3-RNP (4-22%) Anti-RP3 (3-19%) Anti-Th/To (4-13%) Anti-PDGFR (<5%) Síndromes de solapament: Anti-PM/Sci (24-55%) Anti-Ku (2-33%) Anti-U1-RNP (8-10%) Altres: Anti-Ro52 (25-30%) FR (20-30%) Anti-IFI16 (21-29%) Anti-Ro60/SS-A (8-10%) Anti-NOR90 (<5%) Anti-U11/12-RNP (<5%) Anti-RuvBL1/2 (<5%) Anti-AT1R (---) Anti-ETAR (---) Anti-BICD2 (---)	Marcadors: ACPA (70-80%) FR (60-80%) Altres: Anti-col·lagen tipus II (23-70%) Anti-CEP-1 (24-62%) Anti-CarP (30-45%) Anti-PAD (23-45%) Anti-RA33 (25-35%) Anti-Ro60/SS-A (20-30%) Anti-Ro52 (8-10%)

9. Biomarcadors de les Malalties Autoimmunitàries

La **medicina de precisió** es basa en l'**atenció individualitzada** del pacient tenint en compte les singularitats pròpies de cada individu (173–175). Per això, els principals reptes de la medicina actual són la millora dels processos fonamentals d'aquesta atenció: la **prevenció**, el **diagnòstic**, el **pronòstic**, el **tractament** i la **rehabilitació**. En relació amb les MA, la complexitat d'aquests processos fa que la cerca de nous biomarcadors, encara avui en dia, continuï essent prioritària per facilitar una intervenció més precoç i, així, tenir una millor resposta al tractament i la capacitat de modificar el pronòstic dels pacients.

Els **biomarcadors** són elements biològics, mesurables i avaluables amb la capacitat de diferenciar entre dos o més estats o d'informar del pronòstic o de la probabilitat d'aparició d'una manifestació clínica. En l'àmbit de les ciències de la salut, els podem classificar en 4 grans tipus segons la seva utilitat (176).

9.1. Tipus de biomarcadors

Els **biomarcadors diagnòstics** aporten informació biològica que afegida a les manifestacions clíniques modifiquen la sospita diagnòstica (probabilitat pre-test) i disminueixen el grau d'incertesa en el procés de confirmar o descartar la presència d'una MA. Un dels seus objectius més importants és facilitar el diagnòstic en la fase d'inici de la malaltia.

Els **biomarcadors d'activitat** correlacionen amb el grau d'activitat clínica en el moment de l'extracció o, fins i tot, poden indicar un canvi imminent en l'activitat. Habitualment també són biomarcadors diagnòstics. Per exemple, els autoanticossos anti-transglutaminasa en el seguiment de la malaltia celíaca, quan augmenten, indiquen que s'ha produït un nou contacte amb l'antigen, en aquest cas per una nova ingesta de gluten.

Els **biomarcadors pronòstics** indiquen el grau de probabilitat d'alguns pacients de desenvolupar una manifestació clínica específica (normalment greu) o de tenir un pronòstic diferent del d'altres pacients.

Els **biomarcadors de resposta al tractament** poden indicar la idoneïtat d'un tractament específic per a un pacient determinat. Poden anar associats a la capacitat de resposta terapèutica al tractament o a la resposta de l'organisme envers el fàrmac (176).

9.2. Propietats dels biomarcadors

Un mètode clàssic per a l'avaluació de la validesa o utilitat d'un biomarcador és l'ús de les **corbes ROC**. Aquestes corbes ROC són representacions gràfiques dels resultats d'un biomarcador on es representen la **sensibilitat** (eix Y) i 1-l'**especificitat** (eix X) per a cada possible resultat i ens ajuden a escollir el punt de tall més adequat. En aquest punt, la definició de les característiques d'inclusió dels individus que tenen la malaltia (**grup de pacients**) i dels que no la tenen (**grup de control**) és clau. El grup control ideal hauria d'incloure controls sans i pacients amb altres malalties susceptibles d'un diagnòstic diferencial amb la malaltia objecte d'estudi. A més, aquests dos grups haurien de ser representatius de la població on s'aplicarà l'estudi d'aquest biomarcador.

9.2.1. El punt de tall

El **punt de tall** d'una prova és aquell valor a partir del qual es considera el resultat com a positiu, i que, ens permet destriar el millor possible els individus que tenen la condició patològica objecte d'estudi dels individus que no la tenen. Qualsevol modificació del punt de tall alterarà sincrònicament la sensibilitat i l'especificitat (quan una augmenti, l'altra tendirà a disminuir).

Hi ha diversos **mètodes** per establir el punt de tall. Alguns són matemàtics i d'altres es basen a fixar quina sensibilitat o especificitat considerem necessària.

Els mètodes matemàtics més utilitzats són el càlcul de l'**Índex de Youden** màxim (en l'eix vertical) o el càlcul del punt que té la menor distància a la **cantonada superior esquerra de la corba ROC** (punt de la prova perfecta: 100% de sensibilitat i 100% d'especificitat). L'Índex de

Youden màxim defineix el punt de la corba ROC que maximitza la suma de la sensibilitat i l'especificitat d'una prova. D'altra banda, el punt més proper a la cantonada superior esquerra de la corba ROC, es pot calcular resolent el Teorema de Pitàgores del triangle rectangle que es forma amb l'eix vertical, el punt escollit i la cantonada superior esquerra (**Figura 11**). Un altre mètode matemàtic utilitzat consisteix a establir el punt de tall al nivell de la **mitjana** dels valors del **grup control** més 2, 4 o, fins i tot, 8 **desviacions estàndard**.

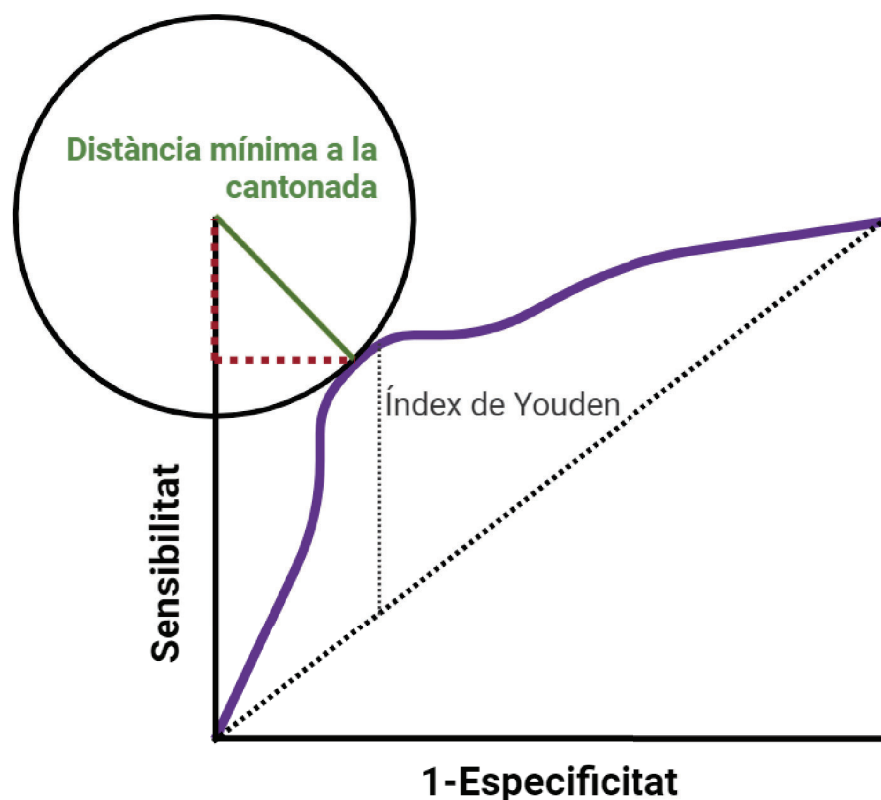


Figura 11. Corba ROC i el càlcul del punt de tall. Partint de la corba ROC (línia lila) podem establir el punt de tall de dues maneres: amb l'Índex de Youden (sensibilitat + especificitat -1) més alt (línia grisa puntejada) o amb el punt més proper a la cantonada superior esquerra (100% sensibilitat i 100% especificitat). Tot i que aquests mètodes matemàtics són els més utilitzats, l'elecció del punt de tall òptim s'ha de fer a partir del problema clínic que es vol resoldre.

9.2.2. Sensibilitat i Especificitat

La sensibilitat i l'especificitat són indicadors estadístics que avaluen el grau d'eficàcia inherent a una prova clínica. Indiquen la rendibilitat clínica d'una prova per discriminar entre individus que pateixen o no la malaltia. La **sensibilitat** d'una prova és la **capacitat de detectar un resultat positiu en pacients amb el diagnòstic** d'una determinada condició clínica. L'**especificitat** d'una prova reflecteix la **capacitat per detectar un resultat negatiu en individus sense un diagnòstic** concret (**Figura 12**).

		Malaltia		
		SI	NO	
Biomarcador	POSITIU	Vertader positiu	Fals positiu	Resultats POSITIVUS
	NEGATIU	Fals negatiu	Vertader negatiu	Resultats NEGATIVUS
		Malalts	Sans	Total

		Malaltia		
		Amb diagnòstic	Sense diagnòstic	
Biomarcador	POSITIU	Vertader positiu (Pacient amb el biomarcador)	Biomarcador positiu en un pacient pre-clínic Fals positiu de la tècnica	Resultats POSITIVUS
	NEGATIU	Fals negatiu de la tècnica Pacient real sense el biomarcador	Fals negatiu de la tècnica (Individu sa sense el biomarcador) Vertader negatiu	Resultats NEGATIVUS
		Diagnosticats de la MA	No diagnosticats de la MA	Total

Figura 12. Taula creuada (o "2x2") utilitzada per a l'avaluació d'un biomarcador en funció de la presència d'una malaltia. Clàssicament, s'ha utilitzat una versió molt simplificada, dividint els resultats en positius o negatius, i els individus en malalts i sans (A) dividint la cohort en 4 possibles opcions. Malgrat això, sabem que per a l'avaluació d'un biomarcador hi ha més factors que cal tenir en compte. Amb relació als individus, hi ha pacients diagnosticats d'una malaltia que poden presentar, o no, el biomarcador estudiat, pacients que encara no tenen manifestacions clíniques, però sí que presenten el biomarcador i, finalment pacients sense clínica ni biomarcador que, se suposa, són individus sans. Pel que fa als resultats de la tècnica, els falsos positius i negatius poden afectar a qualsevol individu analitzat i, en alguns casos coincideixen amb la manifestació clínica, o la seva absència, i poden passar desapercebuts (B).

La sensibilitat i l'especificitat són paràmetres intrínsecs de la prova, **independents de la prevalença** de la malaltia, però que depenen de com s'ajusta el punt de tall (**Taula 2**).

9.2.3. Valors predictius positiu i negatiu

En el procés d'atenció al pacient, es busca determinar si el pacient pateix o no una malaltia en funció del resultat d'una prova. Els valors predictius informen de la **probabilitat de patir** o no **una malaltia tenint un resultat** positiu (VPP) o negatiu (VPN), respectivament. A diferència de la sensibilitat i especificitat, aquests valors predictius sí que **depenen de la prevalença** de la malaltia en la població d'estudi (**Taula 2**). Si la prevalença d'una malaltia a la nostra població d'estudi és alta, un resultat positiu gairebé en confirmarà el diagnòstic, però un resultat negatiu tindrà poc valor. Si, per contra, la prevalença de la malaltia és baixa, un resultat negatiu pràcticament descartarà la malaltia, però un positiu haurà de ser confirmat.

9.2.4. Raons de versemblança

La **raó de versemblança** és la **proporció de resultats** positius o negatius dins del **grup de malalts**, en comparació amb la proporció dins del **grup control**. Per tant, dona una avaluació més clara del grau de probabilitat de trobar un resultat positiu en un pacient que pateix la malaltia en funció de la probabilitat de trobar-lo en un individu sense la malaltia (**Taula 2**).

Un resultat per sobre d'1 augmenta la probabilitat de patir la malaltia mentre que un resultat per sota d'1 la disminueix. A la pràctica, una **raó de versemblança a partir de 10**, gairebé confirma la malaltia i una **per sota de 0.1** la descarta.

Alguns **inconvenients** de les raons de versemblança són: en primer lloc, que cada resultat individual d'un biomarcador té una raó de versemblança única, tot i que els resultats es poden categoritzar en intervals, permetent-ne una interpretació molt més senzilla. En segon lloc, són específiques del mètode utilitzat per obtenir el resultat del biomarcador estudiat. Finalment, la població de malalts i controls utilitzada per al seu

càlcul ha de reflectir la població on seran implementades. Tot i la complexitat de reclutar el primer grup de pacients per calcular les raons de versemblança per primera vegada, els nous pacients es poden incloure posteriorment per tornar a calcular-les, i aquestes raons cada cop seran més acurades.

Taula 2. Indicadors d'un biomarcador.

Indicadors	Sensibilitat (Sens):	$\frac{\text{Vertader positiu}}{\text{Malalts}}$
	Especificitat (Espec):	$\frac{\text{Vertader negatiu}}{\text{Sans}}$
	1-Sensibilitat:	$\frac{\text{Fals negatiu}}{\text{Malalts}}$
	1-Especificitat:	$\frac{\text{Fals positiu}}{\text{Sans}}$
	Valor Predictiu Positiu (VPP):	$\frac{\text{Sens} \times \text{Prev}}{[\text{Sens} \times \text{Prev} + (1 - \text{Espec}) \times \text{Prev}]}$
	Valor Predictiu Negatiu (VPN):	$\frac{\text{Espec} \times (1 - \text{Prev})}{[\text{Espec} \times (1 - \text{Prev}) + (1 - \text{Sens}) \times \text{Prev}]}$
	Raó de versemblança positiva (LR+):	$\frac{\text{Sens}}{(1 - \text{Espec})}$
	Raó de versemblança negativa (LR-):	$\frac{(1 - \text{Sens})}{\text{Espec}}$
	Prevalença (Prev):	$\frac{\text{Malalts}}{\text{Població total}}$
	Odds ratio pre-test (OR PreT):	$\frac{\text{Prev}}{(1 - \text{Prev})}$
	Odds ratio post-test (OR PostT):	$\text{OR PreT} \times \text{LR}$
	Probabilitat post-test:	$\frac{\text{OR PostT}}{(\text{OR PostT} + 1)}$

En tot el procés d'ús dels biomarcadors, el criteri dels professionals implicats en l'atenció al pacient és extremadament rellevant, ja que cal conèixer la **probabilitat pre-test** del pacient i com el resultat d'una prova pot modificar-la (**Figura 13**).

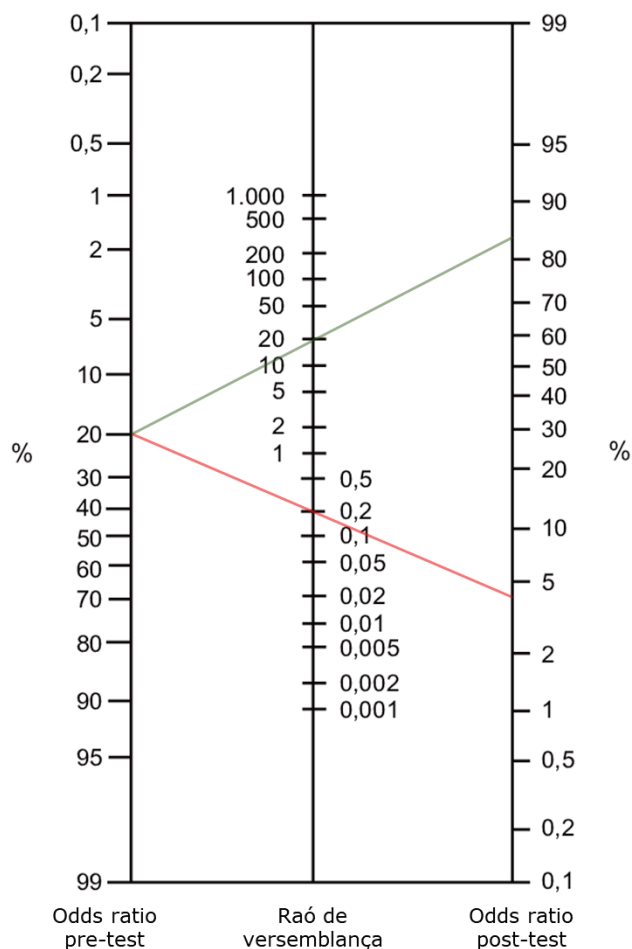


Figura 13. Nomograma de Fagan. Mostra com varia la OR pre-test en funció de les raons de versemblança positiva (línia verda) i negativa (línia vermella), i ens mostra la OR post-test. Cal tenir en compte que la principal limitació d'aquest gràfic és que no treballa amb les probabilitats pre-test i post-test i que s'han de convertir a Odds Ratio.

9.3. Aplicabilitat dels biomarcadors en les malalties autoimmunitàries

9.3.1. Biomarcadors diagnòstics i pacients seronegatius

En les MA, el descobriment d'autoanticossos específics, a vegades com a causants de la patogènia i d'altres únicament com a marcadors de malaltia,

ha estat clau per al diagnòstic dels pacients. Malgrat que hi ha alguns biomarcadors genètics, els **autoanticossos són els biomarcadors més utilitzats**. Tot i que existeixen un nombre molt elevat d'autoanticossos per a l'estudi de les diferents MA, als criteris de classificació només hi estan inclosos els autoanticossos més sensibles, específics i factibles arreu del món. Tanmateix, cap autoanticòs o combinació d'autoanticossos arriba al 100% de sensibilitat i 100% d'especificitat. Hi ha pacients que no presenten els autoanticossos inclosos en els criteris de classificació, però en presenten d'altres, i hi ha altres pacients que no presenten cap autoanticòs, aquests darrers s'anomenen **pacients seronegatius**. Per tant, la recerca de nous biomarcadors associats a les diferents MA té com a objectius principals la **reducció del percentatge de pacients seronegatius** i el **diagnòstic precoç (Figura 14)** (177).

El **LES** es caracteritza per la presència de més d'un autoanticòs simultàniament, criteri o no criteri, però els únics inclosos en els criteris de classificació són els aFL, els anti-dsDNA i els anti-Sm. Els pacients seronegatius d'inici són pocs, però durant el curs de la malaltia, en alguns casos, aquests autoanticossos es poden negativitzar per l'efecte del tractament o de l'evolució de la malaltia (178,179).

En l'**ES**, en canvi, els pacients solen presentar una única especificitat antigènica. Així doncs, si tenim en compte els pacients que no tenen cap dels tres autoanticossos inclosos en els criteris de classificació (ACA, ATA i RP3), el percentatge de pacients seronegatius per aquests autoanticossos pot arribar fins al 20-30%. Quan considerem altres autoanticossos associats a l'ES, com els anti-Th/To o els anti-U3-RNP, entre d'altres, aquest percentatge es pot reduir un 5-10% i un 15-20% si també hi incloem els anti-Ro52, fet que és útil per al diagnòstic (180,181).

Per a la pràctica clínica habitual en l'**AR** només es consideren dos autoanticossos, els ACPA i el FR. El grup de pacients seronegatius d'inici pot arribar a ser d'entre el 20-40%, tot i que amb l'evolució de la malaltia aquest percentatge es va reduint.

D'altra banda, hi ha alguns **autoanticossos que no són específics de cap MA** concreta, però que tenen una prevalença alta en moltes d'aquestes malalties, uns dels més freqüents són els anti-**Ro52**. En algunes

ocasions, els anti-Ro52 poden ser els **únics marcadors** d'una MA, i a més, s'han associat a diverses complicacions (182-185). A banda, la positivitat d'anti-Ro52 en presència d'altres autoanticossos específics, s'ha associat a un **pronòstic més greu de la malaltia**, sobretot en miopaties inflamatòries idiopàtiques (186,187).

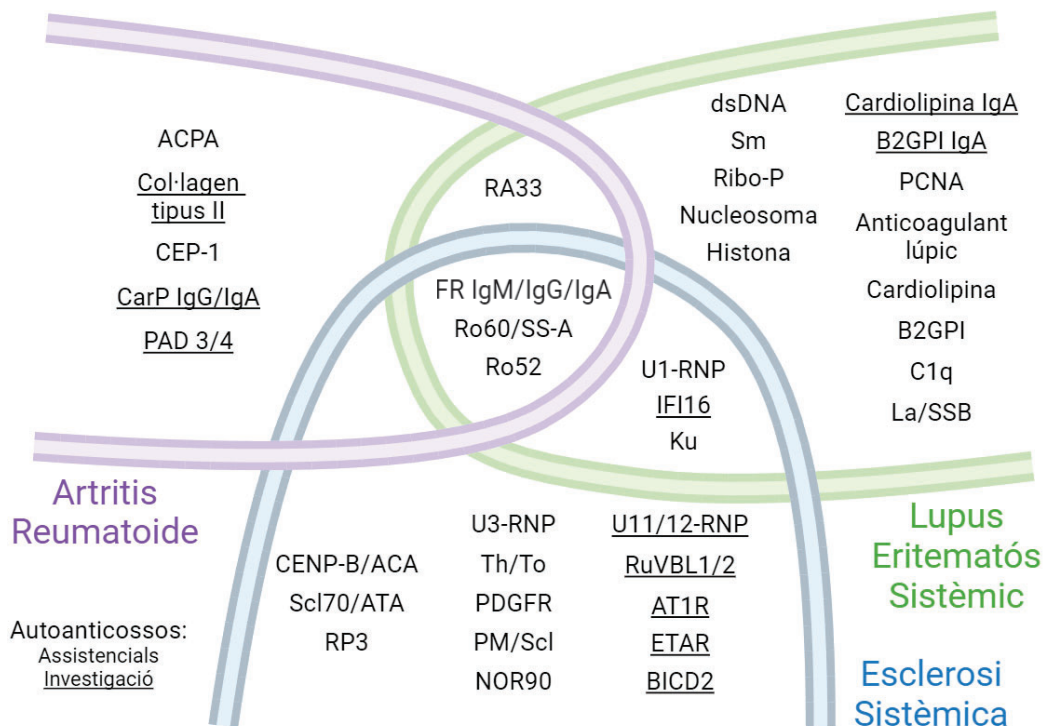


Figura 14. Principals autoanticossos presents en pacients amb lupus eritematos sistèmic, esclerosi sistèmica i artritis reumatoide. En les àrees centrals de superposició s'hi engloben els autoanticossos compartits per les diferents MA. Subratllats hi ha els autoanticossos disponibles en l'àmbit de la investigació en alguns laboratoris assistencials. Adaptada de (177) amb BioRender.com.

9.3.2. Biomarcadors pronòstics i d'activitat

Les MA sovint tenen una expressió clínica en forma de períodes de brots i períodes de remissió. Els biomarcadors, tant d'activitat com pronòstics, en moltes ocasions són similars, ja que se sap que quan una **malaltia** està **activa** el dany orgànic es va acumulant i n'empitjora el pronòstic.

Els biomarcadors per monitorar l'activitat de les MA són relativament escassos, però faciliten la decisió terapèutica. L'**estratificació dels pacients** en funció d'un **pitjor pronòstic** o d'un **risc més elevat** de desenvolupar manifestacions greus, permetrà l'aplicació d'estratègies terapèutiques més adequades i en fases més inicials de la malaltia, que suposaran una millora en la qualitat de vida dels pacients.

En el cas de pacients amb **LES**, els biomarcadors utilitzats avui en dia per al diagnòstic i seguiment de la malaltia són els autoanticossos anti-dsDNA, els nivells de C3 i C4 i l'activitat del complement, així com l'estudi de la funció renal amb un perfil bàsic d'orina (que inclou la proteïnúria) entre altres proves. En el cas dels nivells d'anti-dsDNA i la seva variació al llarg del temps, alguns estudis publicats no confirmen la seva utilitat (188–191). Pel que fa a l'estratificació dels pacients amb un pronòstic pitjor, manquen biomarcadors per a una de les afectacions orgàniques més greus del LES com és la NL.

El principal repte clínic de l'**ES** és la identificació dels pacients amb més risc de desenvolupar manifestacions greus de la malaltia (sobretot MPID, HAP o crisi renal esclerodèrmica). Actualment, aquesta detecció es basa en els canvis clínics, en els paràmetres de la funció respiratòria i en l'ecocardiografia, eines que en alguns casos no són eficaces, són inespecífiques o amb poca capacitat per discriminar. Pel que fa a l'activitat de la malaltia, el seu control es basa en l'exploració física i en proves funcionals dels diferents òrgans i sistemes. Per això, calen biomarcadors que resolguin aquestes necessitats.

Finalment, en l'**AR**, conèixer quins pacients tenen un risc més elevat de patir afectacions extraarticulars o fenotips de la malaltia més greus i progressius, permetrà optimitzar els recursos sanitaris permetent un seguiment més estret a aquells pacients amb un risc més alt. El control de l'activitat de l'AR, actualment s'avalua mitjançant els reactants de fase aguda (inclosos en els criteris de classificació) i, en alguns centres, amb la calprotectina circulant o en femta (192–194).

9.3.3. Biomarcadors de resposta al tractament

A banda de l'estratificació dels pacients en funció del seu pronòstic, fa anys que un objectiu important de la medicina de precisió és el de conèixer el **tractament més adequat** per a cada pacient. En aquest sentit, trobem encara pocs biomarcadors àmpliament establerts per a les MA (195). Actualment, molts pacients amb MA segueixen les línies terapèutiques establertes arran dels diferents assajos clínics i canvien de fàrmac quan se'n demostra la seva ineficàcia. Això endarrereix l'establiment de teràpies efectives en alguns pacients. La medicina personalitzada cerca característiques específiques de grups de pacients que donin informació sobre la **capacitat de resposta** als diferents tractaments disponibles, per tal d'escollir-ne el més efectiu.

9.4. Més enllà dels autoanticossos

En les MA, els autoanticossos són uns dels biomarcadors més importants i els podem trobar gairebé en la totalitat dels criteris de classificació. L'estudi de les **cèl·lules implicades en la RAI** és un abordatge diferent. Malgrat que els limfòcits T tenen un paper clau en la patogènia de les MA, són tècnicament més difícils d'avaluar que els autoanticossos. En aquest àmbit, han sorgit en els darrers anys iniciatives que estudien el repertori dels TCR en pacients amb MA cercant patrons compartits o identificant els antígens diana en cadascuna de les MA (196–200). No obstant això, aquests mètodes depenen de la digestió de la proteïna, de la presentació del seu antígen diana a través de l'HLA, poden estar afectats per polimorfismes o mutacions d'aquests gens (197,201), i per aquestes raons, no estan incorporats a la rutina clínica. En canvi, l'estudi dels limfòcits B productors d'autoanticossos implica menys exigències tècniques, ja que el BCR és un receptor que reconeix l'antigen diana en la seva conformació natural. El seu estudi és una estratègia que fa dècades que s'ha plantejat, amb mètodes com l'ELISpot o la citometria de flux per detectar cèl·lules B productores d'autoanticossos específics (63,202–207), tot i que encara no s'ha consolidat el seu ús en la pràctica clínica habitual (**Figura 15**).

MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES

Factors de risc

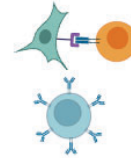
Factors genètics
Sistema HLA
Gens no HLA:
TLR7
TLR9
Canvis epigenètics



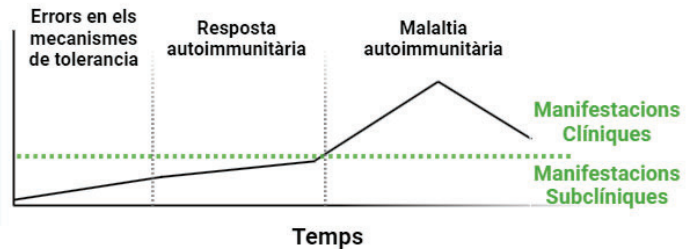
Factors ambientals
Infeccions
Dieta
Tabaquisme
Microbioma



Factors estocàstics
Repertori limfocitari



Resposta vs Malaltia autoimmunitària



Criteris de classificació

✓ Manifestacions clíniques

✓ Autoanticossos

**Lupus Eritematos
Sistèmic**

Anti-dsDNA
Anti-Sm
Anti-fosfolípids

**Esclerosi
Sistèmica**

Anti-CENP-B
Anti-ScI70
Anti-RP3

**Artritis
Reumatoide**

ACPA
Factor Reumatoidal

Reptes

Diagnòstic precoç
Reducció del nombre de pacients seronegatius
LES 10-15%
ES 20-25%
AR 15-20%

Millora de les tècniques de laboratori
Control de l'activitat de la malaltia
Estratificació de pacients
Monitoratge de la resposta al tractament

Nous biomarcadors

**Diagnòstics
Pronòstics
D'activitat**
De resposta al tractament

Figura 15. Resum dels conceptes més importants en relació amb les malalties autoimmunitàries. Els diferents factors de risc incrementen el risc de patir una malaltia autoimmunitària. Tot i això, no parlem de malaltia autoimmunitària fins que n'apareixen les manifestacions clíniques pròpies, però la resposta autoimmunitària, basada en la pèrdua de tolerància, és detectable mesos o anys abans. Els biomarcadors immunitaris que descriuen la resposta autoimmunitària i les manifestacions clíniques més importants han fet desenvolupar uns criteris de classificació que s'utilitzen en la recerca i els assajos clínics. Malgrat tot, encara hi ha un percentatge important de pacients que no disposen de biomarcadors serològics i s'anomenen seronegatius. Cal enfocar la investigació en la recerca de nous biomarcadors que responguin als principals reptes de les malalties autoimmunitàries.



II. Hipòtesis



Un augment del nombre de biomarcadors disponibles amplia la informació a l'abast del clínic i ajuda a una millor la presa de decisions mèdiques i terapèutiques per a l'atenció dels pacients amb malalties autoimmunitàries.

La quantificació dels limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en sang perifèrica aporta informació complementària a la qual s'obté habitualment amb la quantificació d'autoanticossos anti-dsDNA en sèrum, per a l'avaluació de l'activitat del lupus eritematós sistèmic i del risc de desenvolupar nefritis lúpica.

La determinació de l'isotip IgA dels autoanticossos inclosos en els criteris classificatoris de l'esclerosi sistèmica, a més dels anti-Ro52, redueix la proporció de pacients seronegatius i millora l'estratificació dels pacients en funció de les manifestacions clíniques.

La determinació dels isotips IgM i IgA dels autoanticossos inclosos en els criteris classificatoris de l'artritis reumatoide, a més d'altres biomarcadors associats a la malaltia (RA33, CEP-1 i KL-6), redueix la proporció de pacients seronegatius i millora l'estratificació del risc de patir malaltia pulmonar intersticial difusa. A més, la determinació d'aquests biomarcadors s'associa a la mortalitat en un seguiment a quatre anys.





III. Objectius



1. ESTUDI 1: Quantificar els limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en pacients amb Lupus Eritematos Sistèmic (LES) (Publicació 1).

- 1.1. Estandarditzar un mètode ELISpot per a quantificar els limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en sang perifèrica.
- 1.2. Comparar els resultats de l'ELISpot amb la quantificació d'autoanticossos anti-dsDNA i l'estudi del complement en sèrum per a l'avaluació de l'activitat del LES.
- 1.3. Correlacionar els resultats de l'ELISpot amb les manifestacions clíniques de la malaltia.
- 1.4. Avaluar la capacitat predictora dels resultats de l'ELISpot per a l'aparició de brots de LES.

2. ESTUDI 2: Augmentar el nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'estratificació dels pacients amb Esclerosi Sistèmica (ES) (Publicació 2).

- 2.1. Determinar la prevalença dels autoanticossos ACA, ATA, RP3 (inclosos en els criteris classificatoris de l'ES) i els anti-Ro52 d'isotip IgA i IgG.
- 2.2. Correlacionar la presència dels diferents isotips d'autoanticossos amb les diferents manifestacions clíniques de l'ES.

3. ESTUDI 3: Augmentar el nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'avaluació pronòstica de l'Artritis Reumatoide (AR) (Publicació 3).

- 3.1. Determinar la prevalença dels autoanticossos ACPA, FR (inclosos en els criteris), RA33 d'isotip IgM, IgA i IgG i CEP-1 d'isotip IgG i IgA.
- 3.2. Determinar la prevalença de la molècula soluble KL-6.
- 3.3. Correlacionar la presència d'aquests biomarcadors (autoanticossos i KL-6) amb la malaltia pulmonar intersticial difusa associada a l'AR.
- 3.4. Avaluar els factors de risc associats a la mortalitat en un seguiment de quatre anys.



IV. Materials i Mètodes



Estudi 1: Quantificació dels limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en pacients amb Lupus Eritematos Sistèmic

Inclusió de pacients i controls

Els criteris d'inclusió dels pacients amb LES eren: complir els criteris de classificació de l'any 2019 publicats per l'ACR i l'EULAR per al LES (41), el criteri d'exclusió era haver estat sota tractament biològic dirigit als limfòcits B fins un any abans de la mostra o estar-ho durant l'any de seguiment. A més es van incloure com a grup control, pacients amb altres MA i controls sans.

En total, a l'estudi es van incloure 91 individus: 52 pacients amb diagnòstic de LES (recollits de forma consecutiva), 21 pacients diagnosticats amb una MA, però diferent del LES (controls de malaltia) i 18 controls sans. Dels 52 pacients amb LES, 21 tenien un diagnòstic de LES i una altra MA. Els diagnòstics del grup de control de malaltia van ser: artritis reumatoide (n=9), síndrome de Sjögren (n=3), vasculitis sistèmica (n=3), esclerosi sistèmica (n=3), sarcoïdosi (n=1), síndrome antifosfolípida (n=1) i malaltia de Crohn (n=1).

Dades clíniques

L'activitat del LES es va establir utilitzant un SLEDAI-2K clínic >4. El brot de LES es va definir, basat en un consens internacional (208), com a un increment mesurable en l'activitat que inclou un empitjorament o l'aparició d'una nova manifestació clínica i que, a més, comporta un canvi terapèutic o un augment en la dosi de tractament. L'afectació renal es va confirmar per biòpsia seguint la classificació de la Societat Internacional de Nefrologia (ISN) i la Societat de Patologia Renal (RPS) de l'any 2003. A més, l'activitat i la cronicitat de la patologia renal es van determinar utilitzant els índexs de l'Institut Nacional de Salut dels EUA (NIH).

Gestió pre-analítica de les mostres i mètodes de detecció

Per a l'ELISpot, les mostres es van processar durant les 6 hores posteriors a l'extracció. A partir de sang perifèrica recollida en tubs amb heparina, es van aïllar les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMC) mitjançant un gradient de densitat (Ficoll). Posteriorment, les PBMC es van congelar a -80°C en 200 μL de medi de cultiu i 200 μL de DMSO al 20%. Per a la quantificació dels autoanticossos anti-dsDNA per CIA i CLIFT, el sèrum es va congelar alíquotat a -20°C . Els estudis del complement es van realitzar amb mostres no congelades de sèrum extretes en el mateix moment.

Per a la determinació dels autoanticossos anti-dsDNA es van utilitzar els reactius de quimioluminescència (CIA) (QUANTA Flash®; Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA) a l'aparell BIO-FLASH® (Biokit, Barcelona, Spain). Els resultats van ser quantitatius i es va utilitzar el punt de tall recomanat pel fabricant de 20 IU/mL. A banda, es va realitzar l'estudi d'aquests autoanticossos per immunofluorescència indirecta sobre *Crithidia luciliae* (CLIFT) (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA) amb una dilució 1:10. Els resultats es van reportar com a negatius o positius i amb un rang arbitrari de 0 a 8 d'acord amb la intensitat de la fluorescència en comparació a un control positiu (1:160). El sistema del complement (C3, C4 i CH50) es va mesurar mitjançant un assaig turbidimètric Atellica CH C3 i Atellica CH C4 (Siemens, New York, NY, USA), i Autokit CH50; (Fujifilm Wako Chemicals, Neuss, Germany), a l'aparell Atellica CH Solution (Siemens, New York, NY, USA). Els valors de referència van ser, 0.870–1.700 g/L per al C3, 0.110–0.540 g/L per al C4 i 28–60 U/mL per al CH50. La hipocomplementèmia es va definir com a un resultat inferior al rang de referència, com a mínim, per a un dels 3 paràmetres.

Per a l'ELISpot, a partir de les condicions establertes per Hanaoka (209), es van provar unes altres condicions i es van escollir les millors. Els canvis més importants respecte del disseny de Hanaoka van ser l'eliminació del tractament del dsDNA amb nucleases i el canvi d'estratègia de fixació de l'antigen, passant de la fixació amb albúmina a l'ús de la DNA Coating Solution® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

L'assaig d'ELISpot es va fer de la manera següent: les plaques de PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) es van sensibilitzar amb 100 µL de DNA de timus de vedella (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluït 100 µg/mL amb DNA Coating Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Després d'una incubació nocturna a 4°C, la placa es va rentar amb la solució de rentat (PBS amb 0.5 mM CaCl₂ i 0.05% de Tween 20) i es va bloquejar amb la solució de bloqueig (PBS amb el 5% FBS i el 3% BSA) durant 1 h 30 min. Les cèl·lules dels pacients es van descongelar amb medi de cultiu RPMI a 37°C i se'n va estudiar la viabilitat amb la cambra de Neubauer i una tinció amb blau tripà. Les PBMC dels pacients (50 µL/pou a 10×10^6 PBMC/mL, per tant, 500.000 PBMC/pou), així com mostres de sèrum sense diluir (de pacients i controls), es van incubar durant 4 h a 37°C. Després d'aquesta incubació les plaques es van rentar amb solució de rentat i s'hi va afegir un anticòs secundari de cabra anti-IgG humana conjugat amb fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (80 µL/pou, diluït 1:1000 en PBS-Ca) i es va deixar incubar durant 2 h. En acabat s'hi va afegir Nitro Blue Tetrazolium solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (100 µL/pou) durant 7–10 min per tal de revelar, com a "spots" dins del pou, els immunocomplexos formats entre els autoanticossos produïts per les cèl·lules dels pacients i l'anticòs secundari anti-IgG humana. Després d'aturar la reacció enzimàtica amb aigua de l'aixeta, les plaques es van assecar en una estufa seca durant 1 h a 37°C i es van emmagatzemar posteriorment a 4°C.

Els "spots" es van comptabilitzar automàticament amb el comptador ELISpot Reader (AID ELISpot ELRIFL04) amb el programari ELISpot Reader version 7.0 (AID GmbH, Penzberg, Germany).

Per tal d'assegurar la correcta sensibilització de la placa i l'especificitat de l'assaig, es van introduir les següents modificacions: es van afegir PBMC i sèrums en pous no sensibilitzats amb dsDNA i es va incloure un control negatiu (medi de cultiu) i tres controls positius: un sèrum positiu tant per CIA com per CLIFT i un control positiu només per a cada una de les tècniques **(Figura 16)**.

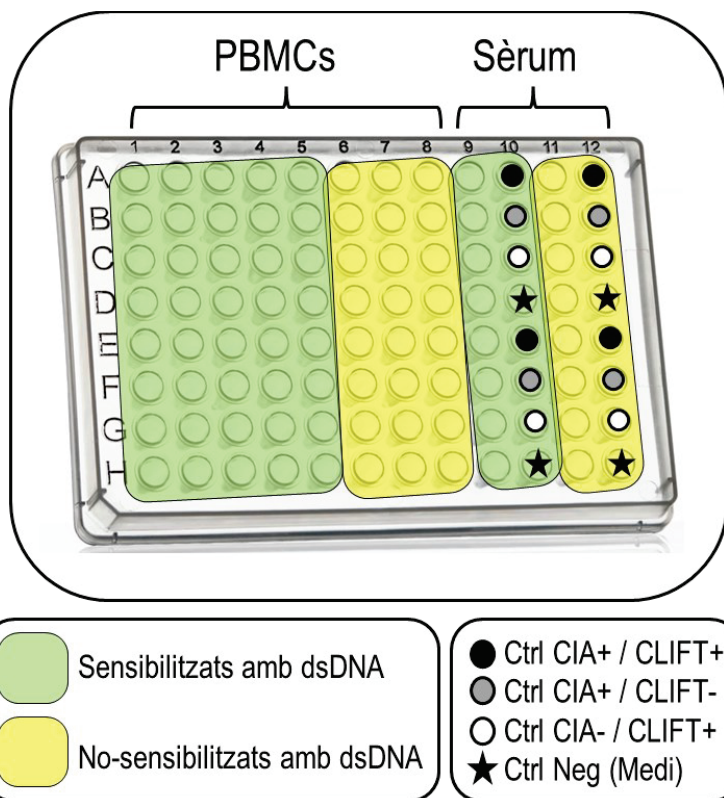


Figura 16. Disseny de la placa d'ELISpot després de les modificacions a l'assaig original de Hanaoka et al. (209)

Estudi 2: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'estratificació dels pacients amb Esclerosi Sistèmica

Inclusió de pacients i controls

Els criteris d'inclusió dels pacients amb ES eren: complir els criteris de classificació de l'any 2013 publicats per l'ACR i l'EULAR per a l'ES. Tots els pacients inclosos formaven part del registre espanyol d'ES (RESCLE). Es van incloure 147 individus a l'estudi, 97 pacients amb diagnòstic d'ES i 50 controls sans.

Dades clíniques

Es van recollir les dades clíniques dels pacients en el moment de l'obtenció de la mostra. Les categories clíniques revisades incloïen el fenotip cutani, les manifestacions musculoesquelètiques, vasculars i l'afectació pulmonar, renal i del tracte gastrointestinal. Aquestes dades conformaven 12 categories: fenomen de Raynaud, úlceres digitals, telangièctasis, calcinosis, miositis, artritis, afectació esofàgica i/o intestinal, malaltia pulmonar intersticial difusa (greu si la capacitat vital forçada era de menys del 70%), hipertensió pulmonar, crisi renal esclerodèrmica i la presència de neoplàsies.

Mètodes de detecció

Es van estudiar els isotips IgG i IgA dels 3 autoanticossos inclosos als criteris de classificació de l'ES, ACA, ATA i RP3, a més dels anti-Ro52. Aquests autoanticossos es van quantificar per FEIA a la plataforma EliA (Thermo Fisher Scientific, Sweden). A la plataforma EliA, es disposa d'una corba de calibratge per a cadascun dels isotips testats. El punt de tall per a l'isotip IgG va ser el recomanat pel fabricant (7 U/mL). El punt de tall per a l'isotip IgA es va fixar a partir dels 50 controls sans establint, com a mínim, un 98% d'especificitat (1.65 µg/L), ja que no existia la recomanació del fabricant. Per ambdós isotips, IgG i IgA, els resultats es van considerar negatius (per sota del punt de tall), positius dèbils (aquells situats entre 1-5 vegades el punt de tall), i positius intensos (aquells per sobre de 5 vegades el punt de tall).

Estudi 3: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'avaluació pronòstica dels pacients amb Artritis Reumatoide

Inclusió de pacients i controls

Els criteris d'inclusió de pacients amb AR eren: complir els criteris de classificació de l'any 2010 publicats per l'ACR i l'EULAR per a l'AR. Es van excloure els pacients amb una altra MA concomitant. Es van incloure 225 individus a l'estudi, 175 pacients amb diagnòstic d'AR i 50 controls sans.

Dades clíniques

Es van recollir les dades clíniques dels pacients en el moment de l'obtenció de la mostra i es va fer un seguiment a 4 anys per veure l'aparició d'afectació pulmonar i la mortalitat. Les dades clíniques recollides incloïen dades demogràfiques, informació sobre l'hàbit tabàquic, informació referent al diagnòstic, evolució i tractament de l'AR, i informació de les proves de funció respiratòria i imatge pulmonar en aquells pacients que les tenien. L'avaluació de l'afectació pulmonar es va realitzar a qualsevol pacient amb sospita clínica segons el seu reumatòleg de referència (dispnea, tos seca, auscultació de "velcro" o troballes accidentals sense explicació per altres causes), i es va seguir l'algoritme diagnòstic del Comitè Multidisciplinari de Malalties Intersticials de l'Hospital Clínic, que inclou tomografia computada d'alta resolució (TCar), proves de funció respiratòria (FVC i DLCo), biòpsia pulmonar, si s'escau, i decisió diagnòstica multidisciplinària.

Mètodes de detecció

Es van estudiar els isotips IgM, IgG i IgA dels autoanticossos FR, ACPA (inclosos als criteris classificatoris) i RA33. Aquests autoanticossos es van detectar per FEIA a la plataforma EliA (Thermo Fisher Scientific, Sweden). A la plataforma EliA, es disposa d'una corba de calibratge per a cadascun dels isotips testats. Els punts de tall utilitzats van ser els ja publicats en un altre treball (98) utilitzant la mateixa metodologia. De totes maneres, es van

calcular els punts de tall amb els 50 controls sans fixant una especificitat del 96% i els resultats van ser similars (**Taula 3**).

Taula 3. Punts de tall dels biomarcadors publicats (98) i calculats amb un grup de 50 controls sans. En gris els autoanticossos inclosos als criteris de classificació.

	Punt de tall propi	Punt de tall publicat
FR IgM	2.6 IU/mL	3.5 IU/mL
ACPA IgG	1.4 U/mL	7 U/mL
FR IgG	14.9 µg/L	28 µg/L
FR IgA	6 IU/mL	14 IU/mL
ACPA IgM	101.6 U/mL	116.7 U/mL
ACPA IgA	3.5 U/mL	7 U/mL
RA33 IgM	36.5 µg/L	32 µg/L
RA33 IgG	7.5 µg/L	12 µg/L
RA33 IgA	4.7 µg/L	4.5 µg/L

A més, es van estudiar els isotips IgG i IgA per als autoanticossos anti-CEP-1. El mètode utilitzat per a l'estudi dels autoanticossos IgG anti-CEP-1 va ser l'ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany), i per l'estudi de l'isotip IgA es va emprar el mateix ELISA, però es va substituir l'anticòs secundari anti-IgG humana per un anticòs secundari anti-IgA humana (Euroimmun, Lübeck, Germany). El punt de tall per a l'isotip IgG va ser el recomanat pel fabricant (20 RU/mL). Els resultats per a la IgA es van expressar com a ràtio entre l'absorbància de cadascun dels pacients en relació amb un conjunt de controls sans inclosos en cada placa d'ELISA. El punt de tall va ser calculat amb una corba ROC entre pacients amb AR i MPID i pacients amb AR sense MPID, i es va establir en una ràtio d'1.05.

Els nivells de la proteïna KL-6 es van mesurar per quimioluminescència amb el kit Lumipulse G KL-6 (Fujirebio, Tokyo, Japan). Tot i que el fabricant recomana un punt de tall de 500 U/mL, aquest mètode s'utilitza en el laboratori de l'Hospital Clínic i s'ha establert un rang de normalitat en la població sana que va de 118 a 627 U/mL. Aquest va ser el punt de tall utilitzat, ja que és el que s'utilitza en la pràctica clínica assistencial.

Anàlisi estadística aplicada en tots els estudis

Per a l'anàlisi estadística es van utilitzar els programaris IBM SPSS Statistics PC Package (Versió 22) i GraphPad Prism (Versió 8.3).

Els resultats de p valor <0.05 van ser considerats estadísticament significatius. Els punts de tall es van establir amb la utilització de corbes ROC. Els conjunts de dades contínues es van descriure amb la mitjana i la desviació estàndard o la mediana i el rang interquartílic (25th-75th) segons la distribució, normal o no, de les dades. Els conjunts de dades categòriques es van descriure amb nombres absoluts i percentatge. La normalitat es va analitzar amb el test de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov depenent de la mida mostral. Les diferències en les proporcions es van analitzar amb el test de χ^2 o amb el test exacte de Fisher quan els recomptes eren <5 . Les diferències en les mitjanes van ser analitzades amb el test paramètric t de Student o amb el test no paramètric U de Mann-Whitney. Les correlacions es van calcular amb la R de Pearson, el coeficient de Spearman o la tau de Kendall segons els tipus de variables. Per a les associacions es va expressar l'oportunitat relativa (Odds Ràtio) i el seu interval de confiança del 95%. Per als càlculs pronòstics es van utilitzar les corbes de Kaplan-Meier o bé el model de risc proporcional de Cox, es va expressar la ràtio de risc (Hazard Ràtio) i el seu interval de confiança del 95%. Les anàlisis multivariants es van analitzar amb el model de regressió logística incloent les variables amb un p valor inferior a 0.15 en les anàlisis univariants. Les comparacions múltiples es van corregir amb un False Discovery Rate del 0.05.





V. Resultats





Estudi 1: Quantificació dels limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en pacients amb Lupus Eritematos Sistèmic

1.1. Cohort d'estudi

No es van trobar diferències significatives pel que fa a dades demogràfiques (edat i sexe), dades clíniques (SLEDAI-2K clínic, afectació orgànica i brots de la malaltia) o dades de laboratori (títols d'autoanticossos i consum del complement), entre el grup de pacients amb diagnòstic de LES i els pacients amb diagnòstic d'una altra MA a banda del LES (**Taula 4**). Per això, tots els pacients amb diagnòstic de LES, aïllat o en combinació amb el d'una altra malaltia, es van analitzar conjuntament.

1.2. Disseny de l'assaig d'ELISpot

La **Figura 16** mostra el disseny actual de l'assaig després de les modificacions aplicades. Els resultats de l'ELISpot inclouen un rang de 0 a ∞ i es calculen com la diferència entre la mitjana de spots en els pous sensibilitzats amb dsDNA i en els no sensibilitzats.

1.3. Rendibilitat clínica de l'ELISpot, la CIA i la CLIFT

Es van establir dos punts de tall per a cadascuna de les tècniques a través de l'Índex de Youden més alt de les diferents corbes ROC. Un primer punt de tall "diagnòstic" comparant, a la corba ROC, pacients amb LES i controls sans, i un segon punt de tall "d'activitat" comparant pacients amb LES actius i no actius.

El **punt de tall diagnòstic** per a la CIA i la CLIFT, va coincidir amb els recomanats pel fabricant (≥ 20 IU/mL i ≥ 1 (negatiu o positiu), respectivament). La sensibilitat i l'especificitat d'aquestes dues tècniques va ser del 87.0% i del 88.9% per la CIA i del 64.8% i del 100% per la CLIFT. Pel que fa a l'ELISpot, el punt de tall diagnòstic va ser de ≥ 1.8 spots amb una sensibilitat del 64.8% i una especificitat del 77.8%. Com era d'esperar, la CIA i la CLIFT van mostrar millor rendibilitat diagnòstica que l'ELISpot (**Figura 17**).

Taula 4. Característiques demogràfiques i clíniques dels grups inclosos en l' estudi de LES.

	Grup controls		Grup LES		
	Grup controls sans (n=18)	Grup control de malaltia (n=21)	Grup LES (n=31)	Grup LES amb una altra MAS (n=21)	p valor
Característiques demogràfiques					
Sexe femení, n (%)	16 (88.9%)	17 (81.0%)	29 (93.5%)	19 (90.5%)	1.000
Edat, mitjana anys (±DE)	32 ± 10	55 ± 13	41 ± 15	46 ± 16	0.183
Paràmetres de laboratori					
Autoanticossos anti-dsDNA (CIA), mitjana (±DE)	12.4 ± 5.6	49.6 ± 68.9	209.0 ± 223.4	163.8 ± 192.8	0.441
Autoanticossos anti-dsDNA (CLIFT), n (%)	0 (0.0%)	4 (19.0%)	21 (67.7%)	13 (61.9%)	0.769
Hipocomplementèmia, n (%)	-	-	17 (54.8%)	13 (61.9%)	0.776
Activitat malaltia					
SLEDAI-2K, mediana [RIQ]	-	-	4 [2-13]	4 [4-8]	0.784
LES Actiu (cSLEDAI-2K>4), n (%)	-	-	13 (41.9%)	8 (38.1%)	1.000
Afectacions orgàniques (a la inclusió)					
Afectació renal, n (%)	-	-	19 (61.3%)	9 (42.9%)	0.259
Activa, n (%)	-	-	10 (45.5%)	6 (33.3%)	0.526
Crònica, n (%)	-	-	16 (57.1%)	8 (40.0%)	0.380
Afectació articular, n (%)	-	-	4 (12.9%)	4 (19.0%)	0.700
Afectació hematològica, n (%)	-	-	5 (16.1%)	3 (14.3%)	1.000
Afectació cutània, n (%)	-	-	4 (12.9%)	3 (14.3%)	1.000
Serositis, n (%)	-	-	5 (16.1%)	2 (9.5%)	0.687
Seguiment dels pacients					
Pacients amb brot, n (%)	-	-	8 (25.8%)	6 (28.6%)	1.000
Pacients amb brot renal, n (%)	-	-	4 (12.9%)	3 (14.3%)	1.000
Dies fins al brot, mitjana (±DE)	-	-	238 ± 99	150 ± 88	0.285

Tenint en compte el **punt de tall d'activitat**, els valors van quedar fixats en ≥ 11.24 spots, ≥ 374.1 IU/mL i ≥ 1 , per a l'ELISpot, la CIA i la CLIFT, respectivament. Les sensibilitats van ser de 57.1%, 42.9% i 71.4% i les especificitats, de 83.9%, 96.8% i 41.9%, respectivament. L'Índex de Youden més alt de les tres tècniques va ser el de l'ELISpot i, per tant, permetia diferenciar millor els pacients actius i no actius (Índex de Youden: 0.410, 0.397 i 0.133, per ELISpot, CIA i CLIFT). Arran d'aquests resultats, a l'estudi es va emprar del punt de tall d'activitat i, els resultats per sobre es van anomenar "alts" i els resultats per sota, "baixos" (**Figura 18**).

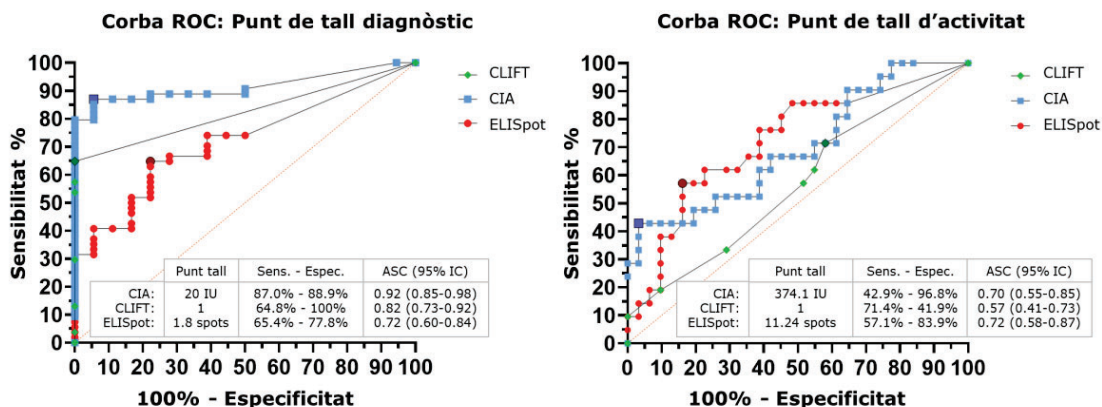


Figura 17. Corbes ROC per a l'elecció dels punts de tall diagnòstic i d'activitat per a les diferents tècniques (CIA, CLIFT i ELISpot). En el cas del punt de tall diagnòstic es van comparar malalts de LES amb controls sans i en el cas del punt de tall d'activitat, pacients amb LES actiu amb pacients de LES no actiu.

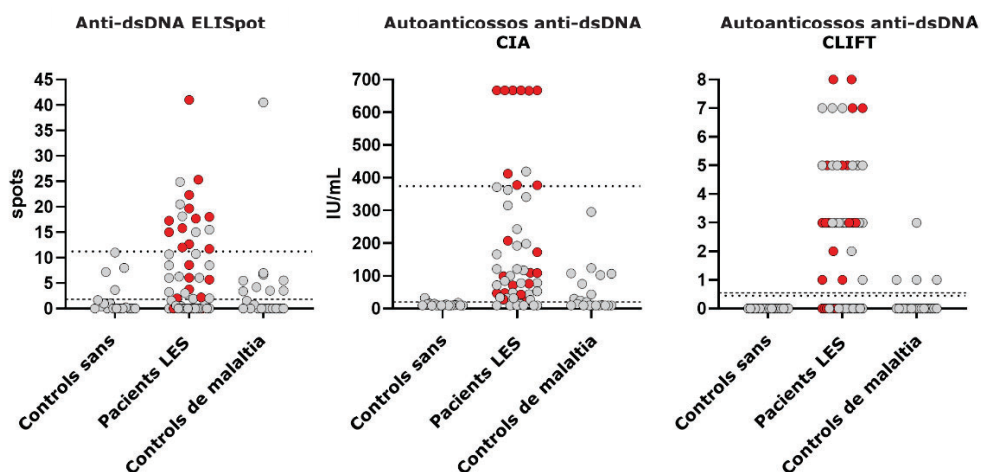


Figura 18. Distribució dels valors dels diferents grups en funció de la tècnica utilitzada. En vermell es mostren els pacients actius (amb un cSLEDAI-2K > 4). Les línies puntejades indiquen el punt de tall diagnòstic i d'activitat.

1.4. Associació amb les manifestacions clíniques

En el moment de la inclusió, l'afectació renal (n=28) va ser l'afectació orgànica més prevalent seguida per l'afectació articular (n=8), l'hematològica (n=8), la cutània (n=7) i, en últim lloc, la presència de serositis (n=7). La hipocomplementèmia es va associar a la nefritis lúpica (OR 7.3 [95% IC 2.1–25.3]). Valors alts de CIA es van associar a l'afectació articular i a l'hematològica (OR 6.3 [95% IC 1.2–32.4] i OR 6.3 [95% IC 1.2–32.4], respectivament). Resultats alts d'ELISpot es van associar a la presència d'alteracions hematològiques (OR 23.8 [95% IC 2.6–217.1]). La presència simultània de resultats alts d'ELISpot i d'hipocomplementèmia es van associar a alteracions articulars (OR 6.3 [95% IC 1.4–26.9]).

1.5. Capacitat predictiva de brot

Dels 52 pacients amb LES, 14 (26.9%) van patir un brot de la malaltia durant l'any següent a l'extracció de la mostra a estudi. Vuit dels 14 pacients (57.1%) que van patir un brot tenien un resultat alt d'ELISpot mentre que 6 de 14 (42.9%) el tenien baix. A més, 29 dels 35 (82.9%) pacients amb un resultat baix d'ELISpot no van patir cap brot, mentre que 8 dels 17 (47.1%) pacients amb un resultat alt d'ELISpot sí que van patir un brot durant l'any de seguiment. Per tant, els pacients amb un ELISpot alt tenen un risc incrementat 3.4 vegades (HR=3.4 [95% IC 1.1-10.5]) de patir un brot de LES (**Figura 19-C**). Ni els resultats alts de CIA, ni de CLIFT, ni la hipocomplementèmia individualment, es van associar a la presència de brots durant l'any de seguiment (**Figura 19-A,B,D**). Només la combinació d'hipocomplementèmia i d'ELISpot alt va presentar un risc de brot augmentat en 5.2 vegades (HR=5.2 [95% IC 1.3-20-4]) (**Figura 19-E**).

Dels 14 pacients que van patir un brot de LES, 7 (50%) van patir un brot amb afectació renal. Dos d'aquests pacients tenien un ELISpot baix mentre que 5 tenien resultats alts. La hipocomplementèmia estava present en tots 7 pacients (**Figura 19-D**). Per tant, els resultats alts d'ELISpot suposen un increment del risc de brot renal de 6.5 vegades (HR=6.5 [95% IC 1.3-32.2]) (**Figura 19-C**) i en combinació amb la hipocomplementèmia, aquest risc augmenta fins a 32.9 vegades (HR=32.9 [95% IC 4.9-221.3]) (**Figura 19-E**). Per contra, ni la CIA ni la CLIFT es van associar a la presència

d'afectació renal en els brots de LES (**Figura 19-A,B**). Pel que fa als brots articulars (**Figura 19**), cutanis o hematològics, cap mètode s'hi va associar de manera estadísticament significativa.



Figura 19. Capacitat de predicció de brot. Corbes de supervivència Kaplan-Meier i Hazard Ratio per al brot de la malaltia en funció del resultat de les diferents tècniques i la seva combinació tenint en compte el punt de tall d'activitat (PT Act). En blau les corbes estadísticament significatives.

Estudi 2: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'estratificació dels pacients amb Esclerosi Sistèmica

2.1. Cohort d'estudi

Noranta-dues de les 97 (94.8%) pacients incloses eren dones. L'edat mitjana al diagnòstic va ser de 49.5 anys i la durada mitjana de la malaltia, de 7 i 12.7, des del diagnòstic d'ES i des del primer símptoma diferent del fenomen de Raynaud, respectivament. Els fenotips cutanis que es defineixen en l'ES estaven distribuïts de la següent forma: 57 (56.7%) pacients van presentar fenotip cutani limitat, 15 (15.5%) fenotip cutani difús i 27 (27.8%) ES *sine scleroderma*. La distribució dels autoanticossos criteri (isotip IgG) en relació amb els fenotips cutanis es mostra a la **Figura 20**.

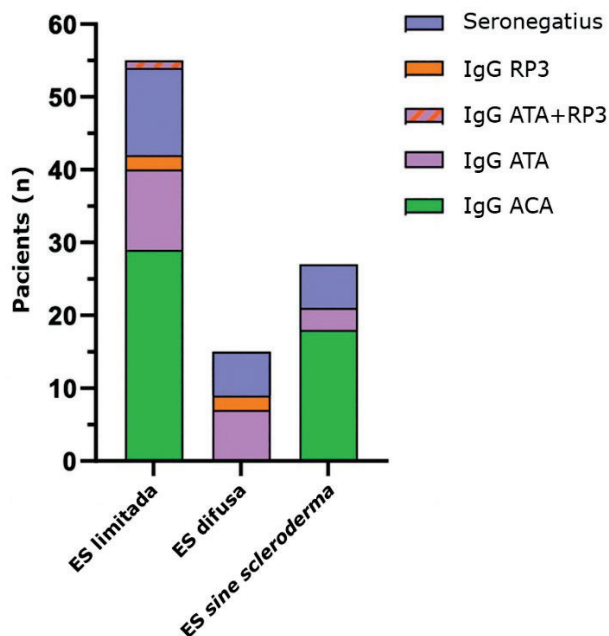


Figura 20. Distribució dels autoanticossos criteri d'isotip IgG en els diferents fenotips cutanis.

2.2. Prevalença dels autoanticossos inclosos als criteris de classificació (isotip IgG).

L'autoanticòs més prevalent va ser l'ACA (48.5%) seguit de l'ATA (22.7%) i l'RP3 (5.2%). Només 1 pacient era doble positiu (ATA i RP3), tot i

que els nivells d'RP3 eren baixos (15.4 U/mL, lleugerament per sobre de 7 U/mL). Els 24 (24.7%) pacients restants van ser negatius per als 3 autoanticossos criteri (ACA, ATA i RP3). No obstant això, tots van ser positius per autoanticossos anti-cel·lulars per immunofluorescència indirecta sobre cèl·lules HEp-2.

2.3. Característiques clíniques

No hi va haver diferències en sexe, edat al diagnòstic i durada de la malaltia entre els grups de pacients definits pels autoanticossos criteri **(Taula 5)**. Les telangièctasis van ser més freqüents en els grups ACA i ATA que en els grups criteri-negatiu i RP3 ($p=0.025$). La MPID va ser més prevalent en el grup amb ATA que en la resta de grups ($p<0.001$). D'altra banda, la miositis només es trobava en el grup de pacients criteri-negatiu i 3 dels 4 pacients que la presentaven eren positius pels autoanticossos anti-Ku i l'altre pels anti-U3-RNP/fibril·larina. A més, tots quatre eren negatius pels autoanticossos anti-Ro52.

2.4. Prevalença de l'isotip IgA dels autoanticossos ACA, ATA i RP3

Dels 97 pacients inclosos, 55 (56.7%) eren positius per autoanticossos d'isotip IgA i 53 dels 55 (96.4%) també ho eren per l'isotip IgG de la mateixa especificitat. En el cas d'ACA, 30 pacients eren dobles positius (IgG i IgA), 17 només IgG i 1 únicament positiu per ACA IgA. Pel que fa als ATA, 19 pacients eren dobles positius, 3 positius per IgG i només 1 positiu per IgA. En el cas dels RP3, tots els pacients eren dobles positius per IgG i IgA **(Figura 21)**. A banda, 4 pacients eren positius per ACA IgA i també per ATA IgG i IgA, aquest fet també es donava en els ATA on 3 pacients eren positius per ATA IgA i positius per ACA IgG i IgA. Pel que fa als RP3, un pacient RP3 IgA també ho era per ATA IgG i IgA. Cal destacar, que la majoria d'aquests últims autoanticossos IgA tenien nivells baixos **(Figura 21)**. La inclusió de l'isotip IgA, va fer reduir el grup de pacients criteri-negatiu en 2 pacients (els 2 IgA aïllats), passant de 24 a 22.

Taula 5. Manifestacions clíniques, fenotips cutanis i característiques demogràfiques de la cohort de pacients amb esclerosi sistèmica segons els autoanticossos inclosos als criteris de classificació. En blau comparacions estadísticament significatives.

	Cohort d'ES (n=97)	ACA IgG positius (n=47)	ATA IgG positius (n=22)	RP3 IgG positius (n=5)	Negatius per autoanticossos criteri (n=24)	p valor
Característiques demogràfiques						
Sexe femení, n (%)	92 (94.8%)	47 (100%)	20 (90.9%)	5 (100%)	21 (87.5%)	0.059
Edat al diagnòstic de l'ES, mitjana anys (±SD)	49.5 ± 15.9	54.1 ± 15.9	46.2 ± 12.0	52.2 ± 12.1	43.1 ± 17.5	0.052
Temps d'evolució i seguiment						
Temps evolució ES des del primer símptoma diferent del Raynaud, mitjana anys (±DE)	12.7 ± 12.3	13.0 ± 12.9	14.5 ± 12.5	5.8 ± 6.6	11.4 ± 11.9	0.518
Temps evolució ES, mitjana anys (±DE)	7.0 ± 10.0	6.7 ± 10.5	9.1 ± 10.4	4.4 ± 7.2	5.8 ± 9.2	0.711
Temps de seguiment, mitjana anys (±DE)	6.5 ± 1.5	6.6 ± 1.6	6.0 ± 1.3	7.2 ± 1.3	6.5 ± 1.6	0.165
Fenotip cutani i autoanticossos						
Fenotip cutani limitat, n (%)	55 (56.7%)	29 (61.7%)	12 (54.5%)	3 (60.0%)	12 (50.0%)	0.807
Fenotip cutani difús, n (%)	15 (15.5%)	0 (0.0%)	7 (31.8%)	2 (40.0%)	6 (25.0%)	<0.001
Fenotip ES <i>sine scleroderma</i> , n (%)	27 (27.8%)	18 (38.3%)	3 (13.6%)	0 (0.0%)	6 (25.0%)	0.186
Autoanticossos anti-nuclears, n (%)	97 (100%)	47 (100%)	22 (100%)	5 (100%)	24 (100%)	1.000
Patró IFI compatible, n (%) (28)	71/73 (97.3%)	46 (97.9%)	21 (95.5%)	5 (100%)	---	0.786
Manifestacions clíniques						
Fenomen de Raynaud, n (%)	94 (96.9%)	47 (100%)	22 (100%)	5 (100%)	21 (87.5%)	0.042
Úlceres digitals, n (%)	18 (18.6%)	7 (14.9%)	8 (36.4%)	0 (0.0%)	3 (12.5%)	0.129
Telangiectasis, n (%)	47 (48.5%)	28 (59.6%)	12 (54.5%)	1 (20.0%)	6 (25.0%)	0.025
Calcinosis, n (%)	9 (9.3%)	5 (10.6%)	2 (9.1%)	1 (20.0%)	1 (4.2%)	0.495
Atritis, n (%) (n=96)	10 (10.4%)	4 (8.7%)	1 (4.5%)	1 (20.0%)	4 (16.7%)	0.870
Miositis, n (%) (n=96)	4 (4.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (16.7%)	0.017
Afectació esofàgica, n (%) (n=95)	62 (65.3%)	32 (68.1%)	14 (66.7%)	3 (75.0%)	14 (58.3%)	0.870
MPID, n (%)	43 (44.3%)	13 (27.7%)	18 (81.8%)	3 (60.0%)	10 (41.7%)	<0.001
MPID greu (CVF <70%), n (%)	17 (17.5%)	6 (12.8%)	5 (22.7%)	1 (20.0%)	5 (20.8%)	0.536
Hipertensió pulmonar, n (%) (n=66)	16 (24.2%)	46.2% MPID	27.8% MPID	33.3% MPID	50.0% MPID	0.462
Crisi renal esclerodèrmica, n (%)	1 (1.0%)	7 (21.9%)	2 (14.3%)	1 (20.0%)	6 (37.5%)	0.268
Neoplàsia, n (%) (n=96)	16 (16.7%)	0 (0.0%)	1 (4.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.728

2.5. Prevalença dels autoanticossos anti-Ro52 d'isotip IgG i IgA

Del total de la cohort, 19 pacients (19.6%) eren positius per autoanticossos anti-Ro52 IgG o IgA. A diferència dels autoanticossos criteri, només 7 dels 19 pacients (36.8%), eren dobles positius per IgG i IgA, 8 pacients eren positius només per IgG i 4 només per IgA (**Figura 21**). Dins dels grups ACA, ATA, RP3 i criteri-negatiu, no hi havia diferències en la prevalença d'anti-Ro52 (14.6%, 26.1%, 25.0% i 22.7%, respectivament).

2.6. Combinació d'autoanticossos

Pel que fa als autoanticossos ACA, en els pacients dobles positius, els títols d'IgG van ser més alts que els d'IgA en el 73.3% dels casos. En canvi, pel que fa als ATA, el 68.4% dels pacients amb ATA IgG i IgA tenien títols alts per als dos isotips. El grup d'anti-RP3 només va tenir 4 pacients i en relació amb els anti-Ro52, tots els pacients dobles positius van tenir títols més alts d'IgG que d'IgA (**Figura 21**).

Dels pacients que tenien positivitats per més d'una especificitat inclosa als criteris de classificació, 8 eren dobles positius per l'isotip IgA (1 ATA-RP3, 7 ACA-ATA) i només 1 ho era per l'isotip IgG (ATA-RP3). Si hi afegim els anticossos anti-Ro52, la positivitat per més d'una diana va ser més freqüent en el grup ATA IgG positius que en l'ACA IgG (39.1% versus 20.8%) (**Figura 21**).

2.7. Associacions clíniques

Pel que fa al fenotip cutani, els pacients amb fenotip limitat eren principalment ACA IgG i IgA, els de fenotip difús ATA IgG i els de fenotip *sine scleroderma* eren Ro52 IgG i IgA i ACA IgG (valors de p no ajustats: 0.029, 0.004, 0.017 i 0.005, respectivament), aquestes associacions però, es van perdre després de la correcció per múltiples comparacions. La presència de Ro52 IgG i IgA era independent de la presència d'ACA IgG ($p=0.124$). Pel que fa a altres manifestacions clíniques, la presència de MPID va ser superior en pacients amb ATA IgG i IgA (valor de p no ajustat: 0.001). Les telangièctasis es van associar a la presència d'ACA IgG i IgA (valor de p no ajustat: 0.027).

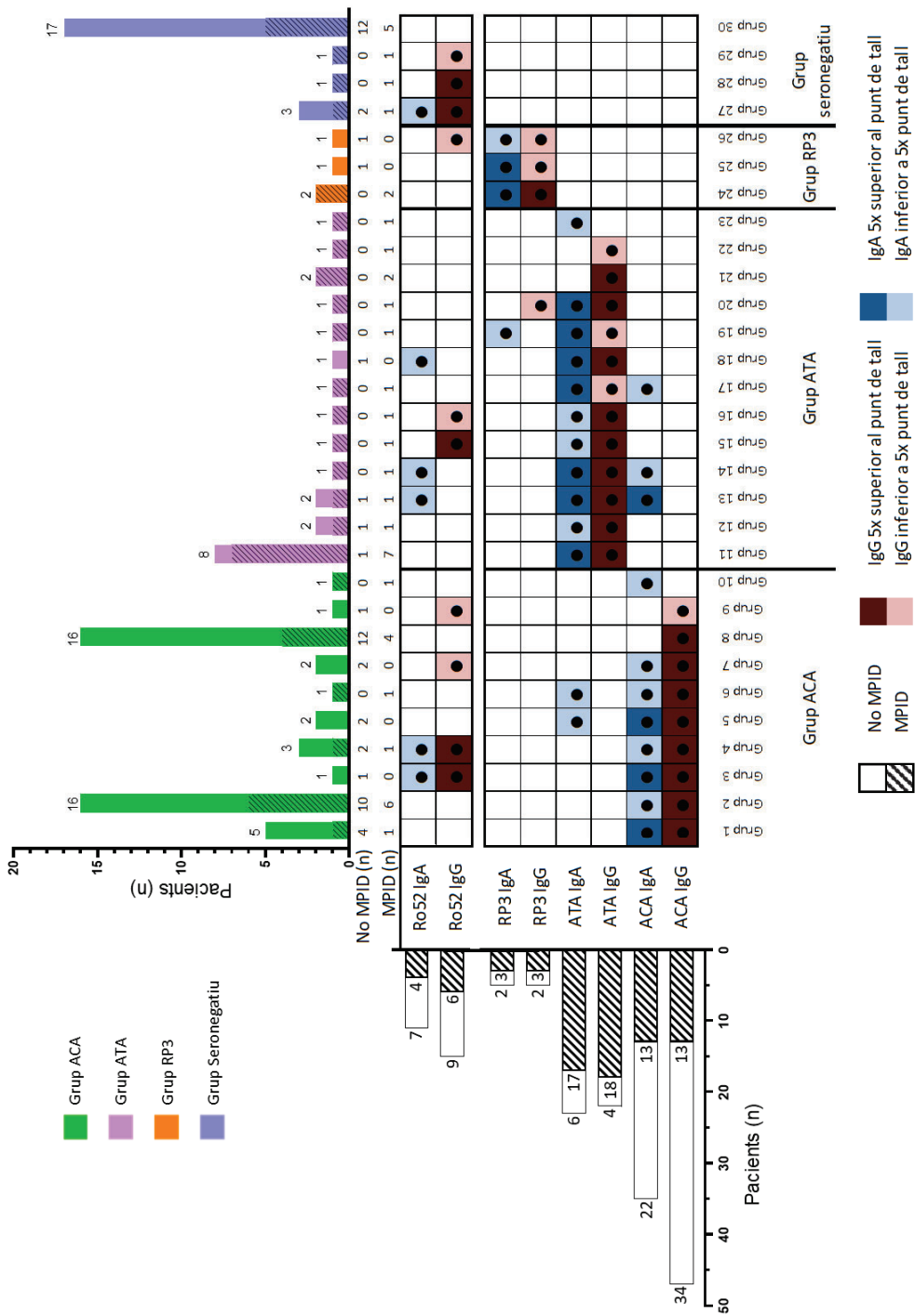


Figura 21. UpSet plot que mostra la combinació d' autoanticossos en la cohort d' ES. Les barres a l' esquerra indiquen el nombre de pacients amb MPID i sense que tenen l' autoanticòs positiu. Les columnes representen els pacients amb MPID i sense que tenen aquell mateix perfil d' autoanticossos. Les columnes verdes indiquen els pacients del grup ACA, les illes els del grup ATA, les taronges els del grup RP3 i les blaves els del grup seronegatiu. Les diferents positivitats (marró per IgG i blau per IgA) estan dividides en títols alts (més de 5 vegades el punt de tall) i títols baixos (positiu, però inferior a 5 vegades el punt de tall).

Tot i que les diferències no eren estadísticament significatives, tres dels 5 pacients (60.0%) monoespecífics per Ro52 tenien MPID, mentre que només 35 dels 78 (44.9%) negatius per Ro52 en tenien (OR: 1.84; p valor=0.656). No es van trobar associacions clíniques en pacients amb autoanticossos criteris en funció de la presència o absència de Ro52. Tot i això, hi havia una tendència cap a la presència simultània de Ro52 i el fenotip cutani difús (28.6% de fenotip difús en els Ro52 positius i 8.5% en els Ro52 negatius).

Estudi 3: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'avaluació pronòstica dels pacients amb Artritis Reumatoide

3.1. Cohort d'estudi

Cent trenta-quatre dels 175 (76.6%) pacients inclosos eren dones. L'edat mitjana al diagnòstic va ser de 53 anys i la durada de la malaltia, de 8.9 anys de mitjana amb una mediana de 6.2 anys. Més de la meitat dels pacients (52.0%) havien estat fumadors, tot i que només el 19.4% ho eren actualment. Trenta-set (21.1%) dels pacients estaven diagnosticats de MPID amb una duració mitjana de 2.3 anys. El patró radiològic més prevalent va ser el de NIU (51.4%) seguit del NINE (35.1%).

Els pacients del grup d'AR i MPID eren més grans i feia més temps que s'havien diagnosticat que els pacients que no tenien MPID. A més, també tenien puntuacions d'activitat de la malaltia més altes. No hi havia diferències en l'hàbit tabàquic entre els dos grups. Encara que el 64.9% dels pacients amb AR i MPID eren dones, la MPID era més prevalent en homes (31.7% versus 17.9%; $p=0.079$). Els pacients amb AR i MPID tenien un índex de massa corporal (IMC) superior al dels pacients que només tenien AR. La MPID es tractava més sovint amb abatacept (anti-CTLA4) mentre que els pacients sense MPID estaven tractats amb metotrexat. Tot i això, les dosis eren similars en els dos grups (**Taula 6**).

3.2. Biomarcadors analitzats (ACPA, FR, RA33, CEP-1 i KL-6)

Amb els punts de tall establerts, es va analitzar la capacitat dels biomarcadors de diferenciar pacients amb MPID i sense. Els nivells sèrics de KL-6 van ser el millor marcador (Índex de Youden més alt) (**Taula 7**).

La majoria dels pacients (85.1%) eren dobles positius pel FR IgM i ACPA IgG (els dos autoanticossos inclosos als criteris de classificació). Del 14.9% restant, un 1.1% i un 8% eren positius únicament pel FR IgM o per ACPA IgG, respectivament. Finalment, només 10 pacients (5.7%) eren seronegatius per als autoanticossos criteri i, d'aquests, només 3 eren positius per almenys 1 dels autoanticossos estudiats.

Taula 6. Característiques clíniques i demogràfiques de la cohort de pacients amb artritis reumatoide.

	AR sense MPID (n=138)	AR amb MPID (n=37)	p valor
Característiques demogràfiques			
Sexe femení, n (%)	110 (79.7%)	24 (64.9%)	0.079
Ètnia			
Caucàsic, n (%)	122 (88.4%)	33 (89.2%)	1.000
Mestís llatinoamericà, n (%)	13 (9.5%)	3 (8.1%)	1.000
Asiàtic, n (%)	2 (1.5%)	0 (0.0%)	1.000
Africà, n (%)	1 (0.7%)	1 (2.7%)	0.379
IMC , mitjana (±DE) (n=132)	26.6 ± 4.4	29.9 ± 4.8	0.001
IMC (≥25), n (%)	63 (58.3%)	22 (91.7%)	0.002
IMC (≥30), n (%)	23 (21.3%)	10 (41.7%)	0.065
Baix pes (IMC <18.5), n (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.000
Pes normal (IMC 18.5-24.9), n (%)	45 (41.7%)	2 (8.3%)	0.002
Sobrepès (IMC 25-29.9), n (%)	40 (37.0%)	12 (50.0%)	0.256
Obesitat (IMC ≥30), n (%)	23 (21.3%)	10 (41.7%)	0.065
Característiques de l'Artritis Reumatoide			
Edat al diagnòstic de l'AR, mitjana anys (±SD)	52.0 ± 13.5	57.6 ± 11.5	0.025
Debut precoç AR (<65 anys), n (%) (n=174)	115 (83.3%)	27 (75.0%)	0.333
Temps evolució AR, mitjana anys (±DE)	8.2 ± 8.6	11.8 ± 8.1	0.001
AR erosiva, n (%)	72 (52.2%)	24 (64.9%)	0.195
Presència de nòduls reumàtics, n (%) (n=174)	24 (17.5%)	8 (21.6%)	0.633
Síndrome seca, n (%) (n=174)	18 (13.1%)	8 (21.6%)	0.202
Serositis, n (%) (n=174)	4 (2.9%)	0 (0.0%)	0.580
Activitat de la malaltia			
DAS28-VSG, mitjana (±SD) (n=157)	2.78 ± 1.13	3.78 ± 1.24	<0.001
Remissió clínica (DAS28-VSG<2.6), n (%) (n=157)	62 (51.2%)	9 (25.0%)	0.007
Autoanticossos criteri			
ACPA IgG positiu, n (%)	118 (85.5%)	31 (83.8%)	0.797
FR IgM positiu, n (%)	116 (84.1%)	31 (83.8%)	1.000
Seronegatiu (per ACPA IgG i FR IgM), n (%)	11 (8.0%)	3 (8.1%)	1.000
Hàbit tabàquic			
Alguna vegada fumador, n (%)	70 (51.1%)	21 (56.8%)	0.582
Fumador actual, n (%)	30 (21.9%)	4 (10.8%)	0.164
Dosi tabac acumulada (paq/any), mitjana (±DE) (n=89)	24.5 ± 14.9	30.4 ± 11.0	0.070
MPID			
Test de funció pulmonar			
CVF, mitjana (±SD)	---	78.55 ± 16.23	---
DLCO, mitjana (±SD)	---	60.31 ± 15.31	---
Patró radiològic TCar			
NIU, n (%)	---	19 (51.4%)	---
NINE, n (%)	---	13 (35.1%)	---
Altres, n (%)	---	5 (13.5%)	---
Tractament			
Glucocorticoïdes			
Prednisona, n (%)	82 (59.4%)	25 (67.6%)	0.449
Dosi prednisona (mg/dia), mitjana (±DE)	4.86 ± 3.71	4.91 ± 2.11	0.689
Medicaments modificadors de la malaltia			
Metotrexat, n (%)	89 (64.5%)	15 (40.5%)	0.014
Dosi metotrexat, mitjana (±DE)	20.06 ± 13.58	14.67 ± 3.67	0.142
Leflunomida, n (%)	22 (15.9%)	11 (29.7%)	0.095
Dosi leflunomida, mitjana (±DE)	14.71 ± 5.14	16 ± 5.16	0.596
Hidroxicloroquina, n (%)	17 (12.3%)	3 (8.1%)	0.574
Dosi hidroxicloroquina, mitjana (±DE)	228.57 ± 72.63	266.67 ± 115.47	1.000
Tractaments biològics			
Anti-CTLA4 (Abatacept), n (%)	3 (2.2%)	7 (18.9%)	<0.001
Anti-CD20 (Rituximab), n (%)	7 (5.1%)	1 (2.7%)	1.000
Anti-TNF (varis), n (%)	22 (15.9%)	3 (8.1%)	0.296
Anti-IL6 (Tocilizumab), n (%)	5 (3.6%)	1 (2.7%)	1.000
Inhibidor JAK (Baricitinib), n (%)	1 (0.7%)	0 (0.0%)	0.379

3.3. Associacions amb la MPID

Diferents paràmetres es van associar a la presència de MPID a la cohort d'AR estudiada. Concretament l'edat en el moment del diagnòstic, el temps d'evolució de l'AR, l'IMC i un IMC ≥ 25 i la presència d'activitat de la malaltia. Tot i que no s'observaven diferències en el nombre de fumadors, la dosi de tabac acumulada tendia a ser més alta en el grup d'AR amb MPID, sense assolir significació estadística. El sexe masculí no es va associar a la presència de MPID per la mida mostral, tot i que s'hi observava una tendència **(Taula 7)**.

En relació amb els autoanticossos, el FR IgG, FR IgA, ACPA IgM, ACPA IgA, CEP-1 IgG, CEP-1 IgA i els nivells elevats de KL-6, tenien una major prevalença i unes mitjanes dels seus nivells més elevades en pacients del grup d'AR amb MPID que en pacients del d'AR sense MPID, tot i que només assolien la significació estadística el FR IgG i el KL-6, tant per la prevalença com per la mitjana dels nivells **(Taula 8)**.

En l'estudi dels patrons del TCar, el FR IgG era l'únic biomarcador que s'associava a la MPID específicament amb un patró de NIU. La positivitat d'ACPA IgG era més prevalent en pacients amb patró NIU quan es comparava aquest patró amb altres patrons no-NIU, però també era molt prevalent en l'AR sense MPID. El KL-6 no aconseguia diferenciar entre els pacients amb patró NIU i no-NIU **(Taula 9)**.

Pel que fa a la FVC i la DLCo, només la mitjana de la DLCo era més baixa en els pacients amb patró NIU comparant-los amb els pacients amb patró no-NIU. Tanmateix, cap biomarcador s'associava a diferències en els valors de DLCo o FVC, tot i que en el cas de la FVC s'hi observava una tendència tant amb l'ACPA IgA com els CEP-1 IgG i IgA (p valor < 0.100) **(Taula 10)**.

Taula 7. Anàlisi univariant amb l'AR amb MPID com a criteri de valoració.

Criteri: Presència de MPID n=175 (n=37 AR amb MPID)	Univariant		
	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
Edat al diagnòstic, (n=174)	<0.001	N/A	N/A
Temps evolució AR, (n=174)	0.001	N/A	N/A
Sexe femení	0.079	0.470	0.213-1.038
IMC, (n=132)	0.001	N/A	N/A
IMC (≥25), (n=132)	0.002	7.857	1.758-35.116
IMC (≥30), (n=132)	0.065	2.640	1.038-6.712
Fumador actual	0.164	0.432	0.142-1.317
Dosi tabac acumulada, (n=103)	0.070	N/A	N/A
Autoanticossos criteri			
FR IgM positiu	1.000	0.980	0.366-2.626
ACPA IgG positiu	0.797	0.876	0.324-2.367
Autoanticossos no criteri			
FR IgG positiu	0.025	2.501	1.180-5.305
FR IgA positiu	0.089	2.077	0.933-4.621
ACPA IgM positiu	0.242	1.628	0.775-3.420
ACPA IgA positiu	0.466	1.321	0.638-2.736
RA33 IgM positiu	1.000	0.979	0.339-2.824
RA33 IgG positiu	1.000	0.929	0.189-4.571
RA33 IgA positiu	0.788	0.759	0.242-2.386
CEP-1 IgG positiu, (n=140)	0.549	1.356	0.620-2.965
CEP-1 IgA positiu, (n=140)	0.280	1.668	0.738-3.772
KL-6 sèric positiu, (n=172)	<0.001	8.750	3.812-20.085
Característiques clíniques			
AR erosiva	0.195	1.692	0.797-3.594
Debut precoç AR, (n=174)	0.333	0.600	0.250-1.443
Presència de nòduls, (n=174)	0.633	1.299	0.529-3.189
Síndrome seca, (n=174)	0.202	1.824	0.722-4.606
Serositis, (n=174)	0.580	0.340	0.021-7.514
Activitat de la malaltia (DAS28-VSG), (n=154)	0.007	3.153	1.369-7.261
Tractament			
Metotrexat	0.014	0.375	0.179-0.789
Anti-CTLA4	<0.001	10.500	2.566-42.973
Leflunomida	0.095	2.231	0.964-5.165
Dosi metotrexat	0.094	N/A	N/A

Taula 8. Punts de tall, prevalença i nivells dels diferents biomarcadors estudiats en els diferents grups de la cohort d'artritis reumatoide. Es van utilitzar els punts de tall ja publicats per Sieghart et al. (98)

	Punt de tall propi *	Punt de tall publicat ^y	Prevalença a la cohort d'AR (n=175)	AR sense MPID (n=138)	AR amb MPID (n=37)	p valor
Krebs von den Lungen (KL-6)						
KL-6 sèric (n=172)	627 U/mL	500 U/mL (fabricant)	37 (21.5%)	17 (12.3%)	20 (55.6%)	<0.001
Prevalença, n (%)				412.3 ± 269.2 U/mL	907.0 ± 804.3 U/mL	<0.001
Nivells, mitjana (±DE)						
Autoanticossos criteri						
FR IgM	2.6 IU/mL	3.5 IU/mL	147 (84.0%)	116 (84.1%)	31 (83.8%)	0.797
Prevalença, n (%)				74.6 ± 108.3 IU/mL	119.3 ± 165.8 IU/mL	0.302
Nivells, mitjana (±DE)						
ACPA IgG	1.4 U/mL	7 U/mL	149 (85.1%)	118 (85.5%)	31 (83.8%)	1.000
Prevalença, n (%)				720.4 ± 1721.6 U/mL	884.9 ± 1295.7 U/mL	0.205
Nivells, mitjana (±DE)						
Autoanticossos no criteri						
FR IgG	14.9 µg/L	28 µg/L	52 (29.7%)	35 (25.4%)	17 (45.9%)	0.025
Prevalença, n (%)				26.5 ± 40.4 µg/L	48.5 ± 69.1 µg/L	0.021
Nivells, mitjana (±DE)						
FR IgA	6 IU/mL	14 IU/mL	105 (60.0%)	78 (56.5%)	27 (73.0%)	0.089
Prevalença, n (%)				64.7 ± 145.1 IU/mL	84.9 ± 194.6 IU/mL	0.151
Nivells, mitjana (±DE)						
ACPA IgM	101.6 U/mL	116.7 U/mL	60 (34.3%)	44 (31.9%)	16 (43.2%)	0.242
Prevalença, n (%)				269.5 ± 551.9 U/mL	400.0 ± 687.3 U/mL	0.446
Nivells, mitjana (±DE)						
ACPA IgA	3.5 U/mL	7 U/mL	85 (48.6%)	65 (47.1%)	20 (54.1%)	0.466
Prevalença, n (%)				23.9 ± 47.5 U/mL	32.4 ± 52.2 U/mL	0.350
Nivells, mitjana (±DE)						
RA33 IgM	36.5 µg/L	32 µg/L	24 (13.7%)	19 (13.8%)	5 (13.5%)	1.000
Prevalença, n (%)				23.8 ± 33.8 µg/L	23.4 ± 20.7 µg/L	0.829
Nivells, mitjana (±DE)						
RA33 IgG	7.5 µg/L	12 µg/L	10 (5.7%)	8 (5.8%)	2 (5.4%)	1.000
Prevalença, n (%)				5.4 ± 4.9 µg/L	5.9 ± 4.6 µg/L	0.295
Nivells, mitjana (±DE)						
RA33 IgA	4.7 µg/L	4.5 µg/L	23 (13.1%)	19 (13.8%)	4 (10.8%)	0.788
Prevalença, n (%)				3.2 ± 3.7 µg/L	2.7 ± 1.4 µg/L	0.739
Nivells, mitjana (±DE)						
CEP-1 IgG (n=140)	20 RU/mL	20 RU/mL (fabricant)	64 (45.7%)	47 (43.9%)	17 (51.5%)	0.549
Prevalença, n (%)				55.6 ± 71.5 RU/mL	71.4 ± 76.7 RU/mL	0.364
Nivells, mitjana (±DE)						
CEP-1 IgA (n=140)	1.05 ratio	N/A	43 (30.7%)	30 (28.0%)	13 (39.4%)	0.280
Prevalença, n (%)				1.19 ± 1.19 ratio	1.53 ± 1.94 ratio	0.526
Nivells, mitjana (±DE)						

Taula 9. Anàlisi de la relació dels biomarcadors amb la presència de MPID i amb el patró radiològic per TCar.

	AR sense MPID vs AR amb MPID			AR sense MPID vs Patró NIU			Patró NIU vs Patró No-NIU		
	AR sense MPID	AR amb MPID	p valor n	AR sense MPID	NIU	p valor n	No-NIU	NIU	p valor n
FR IgM	Negatiu Positiu	22 116	6 31	p=1.000 n=175	22 116	1 18	5 13	1 18	p=0.090 n=37
ACPA IgG	Negatiu Positiu	20 118	6 31	p=0.797 n=175	20 118	0 19	6 12	0 19	p=0.008 n=37
ACPA IgM	Negatiu Positiu	94 44	21 16	p=0.242 n=175	94 44	10 9	11 7	10 9	p=0.743 n=37
ACPA IgA	Negatiu Positiu	73 65	17 20	p=0.466 n=175	73 65	7 12	10 8	7 12	p=0.330 n=37
FR IgG	Negatiu Positiu	103 35	20 17	p=0.025 n=175	103 35	7 12	13 5	7 12	p=0.049 n=37
FR IgA	Negatiu Positiu	60 78	10 27	p=0.089 n=175	60 78	4 15	6 12	4 15	p=0.476 n=37
RA33 IgM	Negatiu Positiu	119 19	32 5	p=1.000 n=175	119 19	16 3	16 2	16 3	p=1.000 n=37
RA33 IgG	Negatiu Positiu	130 8	35 2	p=1.000 n=175	130 8	18 1	17 1	18 1	p=1.000 n=37
RA33 IgA	Negatiu Positiu	119 19	33 4	p=0.788 n=175	119 19	17 2	16 2	17 2	p=1.000 n=37
CEP-1 IgG	Negatiu Positiu	60 47	16 17	p=0.549 n=140	60 47	7 9	9 8	7 9	p=0.732 n=33
CEP-1 IgA	Negatiu Positiu	77 30	20 13	p=0.280 n=140	77 30	9 7	11 6	9 7	p=0.728 n=33
KL-6	Negatiu Positiu	119 17	16 20	p<0.001 n=172	119 17	7 11	9 9	7 11	p=0.738 n=36

Taula 10. Anàlisi de la relació dels diferents biomarcadors amb la FVC i la DLCo.

		FVC (n=32)		DLCo (n=31)	
		Mitjana (%)	p valor	Mitjana (%)	p valor
Patró TCar	No-NIU	82.7	p=0.183	66.5	p=0.028
	NIU	74.9		54.5	
FR IgM	Negatiu	79.9	p=0.870	70.1	p=0.175
	Positiu	78.4		58.9	
ACPA IgG	Negatiu	72.0	p=0.279	67.5	p=0.203
	Positiu	80.1		58.6	
ACPA IgM	Negatiu	74.9	p=0.177	58.5	p=0.494
	Positiu	82.7		62.3	
ACPA IgA	Negatiu	73.3	p=0.082	56.2	p=0.161
	Positiu	83.2		64.1	
FR IgG	Negatiu	77.2	p=0.675	61.7	p=0.651
	Positiu	79.7		59.2	
FR IgA	Negatiu	81.9	p=0.547	66.0	p=0.273
	Positiu	77.6		58.7	
RA33 IgM	Negatiu	78.5	p=0.933	61.1	p=0.495
	Positiu	79.2		55.3	
RA33 IgG	Negatiu	79.3	p=0.317	61.0	p=0.365
	Positiu	67.3		50.7	
RA33 IgA	Negatiu	79.3	p=0.478	61.8	p=0.164
	Positiu	73.1		50.3	
CEP-1 IgG	Negatiu	74.0	p=0.078	59.7	p=0.713
	Positiu	84.6		62.0	
CEP-1 IgA	Negatiu	75.6	p=0.067	58.1	p=0.223
	Positiu	87.0		65.7	
KL-6	Negatiu	80.6	p=0.541	64.5	p=0.249
	Positiu	76.8		57.6	

3.4. Seguiment dels pacients

El seguiment dels pacients va ser de més de 50 mesos (54.3 mesos) des de la seva inclusió a l'estudi. Vint-i-tres (13.1%) pacients van morir: 4 es van excloure de l'anàlisi per COVID-19 actiu en el moment de la mort, 12 pacients (63.2%) tenien AR i MPID i 7 només AR. Dels pacients amb AR i MPID, 8 de 12 (66.7%) van morir per complicacions respiratòries. En la cerca dels factors de risc associats a la mortalitat, el temps d'evolució de l'AR, la presència de MPID i els nivells elevats de KL-6, es van associar a un major risc de mortalitat (**Taula 11**).

Taula 9. Anàlisi univariant amb la mortalitat a 4 anys (excloent COVID-19) com a criteri de valoració.

Criteri: Mortalitat als 4 anys per causes no-COVID-19 n=171 (n=19 morts)	Univariant		
	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
Edat al diagnòstic, (n=170)	0.414	N/A	N/A
Temps evolució AR, (n=170)	0.004	N/A	N/A
Sexe femení	0.080	0.367	0.136-0.987
IMC, (n=130)	0.351	N/A	N/A
IMC (≥ 25), (n=130)	1.000	1.392	0.259-7.477
IMC (≥ 30), (n=130)	0.369	2.325	0.492-10.981
Fumador actual, (n=170)	1.000	1.076	0.333-3.476
Dosi tabac acumulada, (n=103)	0.425	N/A	N/A
Autoanticossos criteri			
FR IgM positiu	0.521	0.703	0.215-2.302
ACPA IgG positiu	0.162	0.424	0.138-1.306
Autoanticossos no criteri			
FR IgG positiu	1.000	1.097	0.393-3.068
FR IgA positiu	0.222	2.036	0.698-5.941
ACPA IgM positiu	0.305	0.484	0.153-1.531
ACPA IgA positiu	0.335	0.583	0.218-1.562
RA33 IgM positiu	0.475	0.328	0.042-2.585
RA33 IgG positiu	0.085	3.884	0.913-16.520
RA33 IgA positiu	0.293	1.867	0.560-6.217
CEP-1 IgG positiu, (n=140)	1.000	0.903	0.316-2.581
CEP-1 IgA positiu, (n=140)	0.569	1.417	0.479-4.191
KL-6 sèric positiu, (n=168)	0.001	5.511	2.032-14.948
Característiques clíniques			
MPID	0.001	5.644	2.082-15.304
Temps evolució MPID, (n=34)	0.730	N/A	N/A
AR erosiva	0.625	1.425	0.532-3.817
Debut precoç AR, (n=174)	0.535	1.851	0.404-8.489
Presència de nòduls, (n=174)	0.208	2.219	0.772-6.376
Síndrome seca, (n=174)	0.743	0.655	0.142-3.026
Serositis, (n=174)	1.000	0.841	0.044-16.215
Activitat de la malaltia (DAS28-VSG), (n=154)	0.115	2.671	0.821-8.692
Tractament			
Metotrexat	0.048	0.360	0.134-0.967





VI. Discussió





La pèrdua de la tolerància immunitària envers elements del propi cos és la característica fonamental de l'aparició de la RAI que, quan provoca dany orgànic, és responsable de l'aparició de la MA. Encara es desconeixen molts aspectes de la patogènia de les MA i el seu diagnòstic es basa en la presència de manifestacions clíniques característiques, i de dades biològiques que es comporten com a biomarcadors, entre elles, els autoanticossos.

Per al diagnòstic de la majoria de les MA, el paper d'aquests autoanticossos ha estat cabdal. Per això, alguns d'ells estan inclosos en els criteris de classificació de les MA. Malauradament, un nombre variable de pacients, segons la MA, no presenten aquests biomarcadors (els anomenats pacients seronegatius). La reducció d'aquest grup de seronegatius és un dels principals reptes de les MA.

D'altra banda, la recerca en biomarcadors de les darreres dècades aborda, més enllà del paper diagnòstic, el seu potencial respecte al pronòstic, l'activitat i la resposta al tractament, entre d'altres. En aquest sentit, manquen biomarcadors amb la capacitat d'indicar la presència o l'evolució de les manifestacions clíniques més greus de les MA i/o d'estratificar els pacients en funció de la seva idoneïtat per a beneficiar-se d'un tractament determinat o de respondre-hi.

1. Lupus Erimatós Sistèmic

Malgrat que el LES va ser descrit durant la segona meitat del segle XIX per Cazenave i Kaposi (210), encara avui en dia la recerca de nous biomarcadors que ens permetin un millor monitoratge de l'activitat del LES i l'estratificació pronòstica dels pacients encara és una necessitat pendent. Per al monitoratge del LES, hi ha molts estudis que demostren la correlació dels títols d'autoanticossos anti-dsDNA amb el nivell d'activitat clínica (189,211). Tot i això, altres estudis no ho confirmen (191,212), i troben fins a un 30% dels pacients en remissió clínica amb títols d'autoanticossos anti-dsDNA persistentment alts (213–215).

Existeixen diversos índexs validats per avaluar l'activitat del LES en els pacients. Els més utilitzats són el British Isles Lupus Assessment Group Index

(BILAG) i l'SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), així com una variant d'aquest últim que és l'SLEDAI clínic (cSLEDAI). El cSLEDAI es calcula igual que l'SLEDAI-2K, però no inclou els resultats dels paràmetres de laboratori (els autoanticossos anti-dsDNA i el consum del complement). Una diferència important entre el BILAG i l'SLEDAI és que l'SLEDAI és un índex global i el BILAG dona una puntuació específica per a cadascun dels òrgans o sistemes. A més, l'SLEDAI només dona importància als símptomes que inclou i només n'avalua la presència o l'absència sense incloure un espectre de la seva gravetat (216). Malgrat que l'EULAR recomana l'ús d'aquests índexs per tal de monitorar als pacients amb LES, la seva aplicació a la pràctica clínica habitual sovint no és senzilla. Per això, la cerca de biomarcadors que correlacionin amb l'activitat actual de la malaltia (en el moment de l'extracció de la mostra), però sobretot que donin informació sobre el risc a curt termini o el pronòstic més a llarg termini, és cabdal.

La primera publicació d'aquesta tesi té per objectiu analitzar si la quantificació de cèl·lules productores d'autoanticossos anti-dsDNA, detectades en sang perifèrica de pacients amb LES, pel mètode d'ELISpot, pot proporcionar avantatges en l'avaluació de l'activitat o del pronòstic de la malaltia. En aquest sentit, se sap que la producció d'autoanticossos és compartida entre els limfòcits B de vida curta (presentes en la circulació perifèrica) i les cèl·lules plasmàtiques (pràcticament limitades a la medul·la òssia) (63,204,217,218), per tant, l'estudi dels limfòcits B de vida curta pot aportar informació rellevant.

A la primera part de l'estudi, s'ha optimitzat el mètode ELISpot prèviament publicat per Hanaoka (209) i s'hi han introduït algunes variacions. En el nostre disseny hi ha pous no sensibilitzats amb dsDNA amb l'objectiu de millorar l'especificitat i s'han establert dos punts de tall diferents: un per al diagnòstic de pacients i l'altre per avaluar l'activitat de la malaltia. Utilitzant el punt de tall per al diagnòstic, l'ELISpot va ser el mètode menys sensible, en comparació amb la quantificació d'autoanticossos anti-dsDNA per CIA i CLIFT, mètodes de rutina clínica habitual. Tanmateix, mitjançant l'ús del punt de tall d'activitat, els resultats de l'ELISpot mostraven més sensibilitat que la CIA i més especificitat que la CLIFT per a la detecció de pacients actius. A més, l'ELISpot tenia l'Índex de Youden més alt de les tres tècniques.

A la segona part de l'estudi, s'ha analitzat l'associació dels resultats de l'ELISpot, de la quantificació d'autoanticossos anti-dsDNA mitjançant CIA i CLIFT, utilitzant el punt de tall d'activitat, i del consum del complement, amb la presència de les diferents manifestacions clíniques en el moment de la inclusió, i també amb l'aparició d'un brot de la malaltia durant l'any següent. Els resultats confirmen l'associació de la hipocomplementèmia i la nefritis lúpica (189,219), i descriu la de la CIA amb l'afectació articular i hematològica, en el moment de la inclusió. En relació amb altres afectacions orgàniques, els resultats de l'ELISpot per sobre del punt de tall d'activitat s'associen amb la presència d'alteracions hematològiques, i la combinació dels resultats alts d'ELISpot i hipocomplementèmia s'associen a l'afectació articular.

Durant el seguiment de pacients amb LES, és important disposar d'eines amb capacitat de predicció del risc de brot. L'estudi previ de Hanaoka (209) va suggerir que l'ELISpot podria ser útil en aquest sentit i els nostres resultats ho corroboren. El 47% dels pacients amb un resultat per sobre del punt de tall d'activitat van tenir un brot durant el primer any de seguiment. Tanmateix, el 83% dels pacients amb un resultat inferior al punt de tall d'activitat, no van patir cap brot. Quan es tenien en compte només els brots amb afectació renal, els pacients amb un ELISpot alt representaven el 57% dels pacients amb brot renal. D'altra banda, només el 29% dels pacients sense brot renal tenien un ELISpot alt. Aquests resultats encara eren millors en afegir-hi l'avaluació del sistema del complement. És a dir, en els pacients que, a més a més d'un resultat alt d'ELISpot, també tenien hipocomplementèmia, el risc de patir un brot de LES o un brot renal era més elevat (HR: 5.2 i HR: 32.9, respectivament).

Per tant, la inclusió, a la pràctica clínica habitual, de l'ELISpot per a la detecció de limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA, ens proporciona un biomarcador amb capacitat de predicció de l'aparició d'un brot durant l'any següent.

Les principals limitacions d'aquest estudi són referents als criteris d'inclusió dels pacients, ja que tots els pacients estudiats estaven sota tractament immunosupressor i l'avaluació de l'impacte d'aquests fàrmacs en l'aparició dels brots és difícilment definible. A més, la cohort conté un alt

percentatge de pacients inclosos (40%) amb altres MA diagnosticades més enllà del LES. Segons les publicacions del Registre de pacients amb lupus de la Societat Espanyola de Reumatologia (RELESSER), el percentatge de pacients amb un diagnòstic addicional al de LES, no és infreqüent (prop del 20%) (220). Tot i això, la inclusió dels pacients a l'estudi és un reflex de la complexitat clínica en l'activitat diària del nostre hospital. D'altra banda, s'ha utilitzat el cSLEDAI-2K com a mesura de l'activitat de la malaltia assumint les limitacions comentades prèviament. No menys important és el fet que l'ELISpot és una tècnica manual, laboriosa, que necessita personal experimentat i, per tant, és complicat poder-la realitzar a gran escala. Així doncs, l'ELISpot no pot substituir la determinació dels autoanticossos anti-dsDNA, però sí que, en alguns pacients, pot aportar informació rellevant sobre el seu pronòstic i el risc de patir un brot de la malaltia en els següents 12 mesos.

2. Esclerosi Sistèmica

A l'ES com a d'altres MA, el diagnòstic precoç és important per als pacients. En aquesta línia, els darrers anys s'han identificat nous autoanticossos que, tot i que molts encara no estan disponibles comercialment, poden ser d'ajut en la reducció del grup de pacients seronegatius, en millorar l'estratificació dels pacients segons el seu pronòstic i en identificar el risc de patir manifestacions clíniques greus. Alguns dels autoanticossos més rellevants d'aquests darrers són els anti-eIF2B, els anti-RuvBL1/2, els anti-proteïna homòloga bicaudal D2 (BICD2) (152,221) o la *valosin-containing protein*, o p97, que s'ha descrit associada a calcinosis i càncer en pacients amb ES (222). Paral·lelament al descobriment de nous autoanticossos, hi ha hagut avenços molt importants en l'àmbit de les molècules solubles que, quan se n'altera la regulació poden activar vies de senyalització o tenen funció patogènica. Alguns exemples són les citocines (IL-1, IL-4, IL-6, TGF- β ...), les quimiocines (CCL2, CXCL4, CCL18...), les molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina...), les metal·loproteases (MMP-7, MMP-9, MMP-12...) i d'altres proteïnes (endotelina, SP-D, col·lagen tipus I i III...) (152,157,221,223-226).

En l'àmbit pronòstic, són importants els estudis amb cohorts extenses que permetin l'anàlisi multivariant amb la correcció estadística, entre d'altres, per als diferents fenotips cutanis. Aquests fenotips cutanis s'associen a la presència d'autoanticossos específics i a la presència de determinades manifestacions clíniques, però els diferents autoanticossos no reproduïen exactament el patró d'associació a les mateixes manifestacions clíniques que marquen els fenotips cutanis (78,83).

A la pràctica clínica, l'estudi dels autoanticossos específics de la majoria de MA, i en concret de l'ES, es limita a l'avaluació de l'isotip IgG. La indicació clínica de l'estudi d'altres isotips diferents (IgA i IgM) està restringida a un nombre reduït de MA, com la cèliaquia o la síndrome antifosfolípida. Tot i això, alguns estudis en el camp de l'ES han explorat el possible paper dels isotips IgM i IgA en la malaltia. En un estudi amb pacients diagnosticats d'ES seropositius (ACA o ATA) es va estudiar la gravetat de la microangiopatia per capil·laroscòpia (227) i la presència de més d'un isotip d'ACA s'associava a una major gravetat. D'altra banda, en un altre estudi amb pacients ATA IgG positius (228), la presència addicional d'ATA IgM, s'associava a la progressió de la malaltia durant l'any següent. Finalment, un estudi amb pacients ACA IgG positius, però amb un diagnòstic de *very early* SSc (ACA IgG i fenomen de Raynaud sense complir els criteris classificatoris d'ES) (229) va demostrar que els nivells basals alts d'IgG podien ser un biomarcador associat a la progressió a ES definitiva.

Per aquest motiu, el nostre estudi analitza la prevalença dels isotips IgG i IgA dels autoanticossos inclosos en els criteris classificatoris de l'ES i dels autoanticossos anti-Ro52 en una cohort de pacients amb diagnòstic d'ES. També s'han estudiat les associacions dels autoanticossos amb les diferents manifestacions clíniques. La conclusió principal és que la majoria dels pacients inclosos són dobles positius (IgG i IgA) per a un mateix autoanticòs dels 3 inclosos en els criteris de classificació.

Només un pacient va ser IgG positiu per ATA i RP3 i el nombre de pacients positius únicament per l'isotip IgA (ACA, ATA o RP3) va ser molt reduït (n=2), motiu pel qual l'estratègia de detecció dels autoanticossos d'isotip IgA no va disminuir el nombre de pacients seronegatius a la nostra cohort.

Pel que fa a les associacions clíniques es va observar que els ACA IgG i IgA s'associaven al fenotip cutani limitat mentre que els ACA IgG aïllat s'associaven al fenotip *sine scleroderma*. A més, la presència dels dos isotips (ACA IgG i IgA) va ser més prevalent en pacients amb telangièctasis i l'ACA IgA aïllat, en pacients amb artritis. Els ATA van ser majoritàriament positius pels dos isotips i es van associar al fenotip cutani difús i a la presència de MPID. Els pacients RP3 positius van ser només 5, tots 5 eren dobles positius i no se'n van poder extreure conclusions.

La prevalença dels anti-Ro52 va ser del 20% i es van distribuir per igual en els 4 grups de pacients (ACA, ATA, RP3 i criteri-negatius). A diferència d'altres cohorts (185,230), la prevalença d'anti-Ro52 va ser menor a la d'ACA i ATA. En relació amb els diferents isotips estudiats, només un 42% dels pacients eren dobles positius (IgG i IgA), un 37% era IgG aïllat i un 21% IgA aïllat. En la majoria dels pacients amb doble positivitat IgG i IgA per als autoanticossos anti-Ro52, els títols van ser alts (més de 5 vegades el punt de tall) per a l'isotip IgG mentre que eren baixos (menys de 5 vegades el punt de tall) per a l'isotip IgA.

Pel que fa a les associacions clíniques, la presència d'anti-Ro52 IgG i IgA es va associar a la presència del fenotip cutani *sine scleroderma*. A més, la presència d'aquesta associació dels pacients amb anti-Ro52 IgG i IgA amb l'ES *sine scleroderma* era independent de la dels autoanticossos ACA IgG aïllat. Altres estudis havien descrit una associació d'anti-Ro52 monoespecífic amb la presència de MPID (185), però en el nostre estudi, la prevalença de MPID va ser similar en el grup anti-Ro52 monoespecífic i en el grup anti-Ro52 negatiu.

La principal limitació d'aquest estudi va ser el nombre de pacients. El fet d'incloure només 97 pacients va limitar la mida dels subgrups (ACA, ATA, RP3, ES cutània limitada, ES cutània difusa i ES *sine scleroderma*). A més, únicament es van testar els autoanticossos inclosos en els criteris classificatoris i els anti-Ro52, per la seva alta prevalença i la seva potencial relació amb la MPID. D'altra banda, no es van comparar diferents tècniques que podrien tenir sensibilitats i/o especificitats diferents. Tot i això, la majoria dels resultats concordaven amb els d'immunofluorescència indirecta, i les possibles discrepàncies eren resultats que es trobaven propers al punt de

tall. A banda, en la cohort estudiada, la prevalença dels autoanticossos ACA i ATA era superior i inferior, respectivament, de les descrites en el registre EUSTAR (83). La prevalença dels anti-RP3 però, era similar. Aquestes diferències poden ser degudes a raons geogràfiques ja descrites a escala europea pel que fa al gradient nord-sud (231,232). Finalment, l'alta prevalença de pacients IgG i IgA dobles positius va limitar els resultats en les associacions clíniques en funció de la presència d'un isotip o un altre.

Així doncs, tot i que aquests resultats s'han de confirmar en altres estudis, suggereixen un paper dels autoanticossos anti-Ro52 independent dels ACA en l'ES *sine scleroderma* que podria atribuir-se a la presència d'anti-Ro52 d'isotip IgA o a l'absència d'ACA d'isotip IgA.

3. Artritis Reumatoide

A l'AR, el diagnòstic precoç de la malaltia és actualment un repte que pot permetre un tractament ràpid que millori el pronòstic i la qualitat de vida dels pacients limitant el dany articular acumulat. A banda, les afectacions extraarticulares de la malaltia suposen una de les causes més importants de morbimortalitat i una de les principals n'és la MPID (101,102,159).

Per al diagnòstic precoç, fa anys que molts estudis s'han centrat a identificar altres autoanticossos específics de l'AR per tal de reduir el nombre de pacients seronegatius (97,98,175,233-237). Pel que fa a la MPID, diversos estudis han descrit associacions entre diferents biomarcadors i la presència de MPID (238-243).

El nostre treball descriu la prevalença dels diferents isotips (IgM, IgG i IgA) dels autoanticossos ACPA, FR, anti-RA33 i els isotips IgG i IgA dels anti-CEP-1 en una cohort de 175 pacients amb AR que compleixen els criteris classificatoris ACR/EULAR de 2010. A més, també s'han quantificat els nivells sèrics de la molècula KL-6.

Pel que fa als punts de tall, hi ha un estudi publicat que utilitzava la mateixa metodologia i establia els punts de tall en funció d'una especificitat del 95% i del 98% en comparació amb un grup de 261 controls de malaltia i 100 controls sans, respectivament (98). Els punts de tall del nostre estudi,

calculats amb un grup control de 50 controls sans i una especificitat del 96%, són similars. Com que el punt de tall per l'ACPA IgG està proper al límit de detecció de la tècnica, s'ha decidit utilitzar els punts de tall ja publicats (98). La prevalença de MPID associada a AR a la nostra cohort és similar a la descrita a l'àrea mediterrània.

Encara que la prevalença de tots els autoanticossos (ACPA IgM i IgA, FR IgG i IgA, CEP-1 IgG i IgA), excepte els inclosos en els criteris (ACPA IgG i FR IgM) i els tres isotips dels anti-RA33, van ser més elevades en el grup d'AR amb MPID que en el grup d'AR sense MPID, les diferències només van ser significatives per al FR IgG. A més, la proporció de positius per KL-6 també va ser estadísticament més elevada en el grup de MPID. Addicionalment, els nivells de FR IgG i els de KL-6 van ser els únics biomarcadors amb les mitjanes dels valors més altes en el grup d'AR amb MPID. L'associació entre la presència d'ACPA IgG i MPID ha estat descrita en uns quants estudis (238,244,245), però no en d'altres (151,246,247). La presència del FR IgM també s'ha associat a la presència de MPID (248), però el nostre estudi no va confirmar ni aquesta associació ni la de l'ACPA IgG amb la MPID, segurament per l'alta proporció de pacients seropositius inclosos (>90% dels pacients van ser ACPA IgG i/o FR IgM positius).

Els autoanticossos anti-RA33 s'han estudiat en el context del diagnòstic de l'AR (249), però no hi ha dades disponibles respecte a la seva relació amb la MPID. El nostre estudi no ha trobat cap relació amb la positivitat ni títol dels diferents isotips d'anti-RA33 i la presència de MPID en l'AR. Finalment, el nostre estudi confirma l'associació de valors positius de KL-6 amb la presència de MPID que ja s'havia descrit en altres estudis (158,161–164).

Per a la presència de MPID en pacients amb AR, les variables associades van ser la presència de KL-6, la positivitat del FR IgG, l'edat al diagnòstic d'AR, la durada de l'AR, l'índex de massa corporal i l'índex d'activitat de la malaltia (DAS28-VSG), a banda d'una tendència cap al sexe masculí. L'associació amb una edat més avançada, una duració més llarga de la malaltia i el sexe masculí, ja s'havien descrit anteriorment (250–252). L'associació amb un diagnòstic de l'AR en edats més joves sembla degut a la correlació inversa entre l'edat al diagnòstic i la durada de l'AR en els nostres

pacients. La presència de MPID estava associada també a un índex de massa corporal $>25 \text{ kg/m}^2$. Aquesta associació ha estat descrita en diversos estudis, però en uns, se li confereix un efecte protector i en d'altres, s'associa a una major prevalença de MPID (251–256). Finalment, la MPID era més prevalent en pacients amb activitat de la malaltia ($\text{DAS28-VSG} \geq 2.6$) tal com també s'havia descrit prèviament (257). D'altra banda, l'associació de la MPID amb l'hàbit tabàquic o la dosi acumulada, no es va confirmar en la nostra cohort, tot i que la dosi acumulada de tabac tendia a ser més alta en els pacients amb AR i MPID.

La presència del patró radiològic de NIU està associada a un pitjor pronòstic de la malaltia. Si comparàvem pacients amb AR i MPID, o bé AR i MPID amb patró NIU, amb pacients d'AR sense MPID, la prevalença del FR IgG i el KL-6 eren diferents entre grups. En canvi, quan es comparaven pacients d'AR i MPID amb patró NIU amb pacients d'AR i MPID amb patró no-NIU, el FR IgG i els ACPA IgG eren els únics biomarcadors amb la capacitat de distingir els dos grups. Per tant, en el nostre estudi, la presència de FR IgG es va associar específicament a la presència de MPID amb aquest patró NIU.

Durant el seguiment a 4 anys, 23 pacients van morir i 4 d'aquests van ser exclosos de l'estudi per concomitància amb infecció per SARS-CoV-2. La taxa de mortalitat que representen els 19 dels 175 (11.1%) pacients és similar a la que es descriu en una metaanàlisi que inclou més de 50000 pacients amb AR entre els anys 1960 i 2010 (258). Els factors de risc que s'hi van associar van ser la durada de l'AR, el KL-6 sèric (HR: 5.5) i la presència de MPID (OR: 5.6), en consonància amb altres estudis (259,260).

Una primera limitació de l'estudi era el baix nombre de pacients negatius per als autoanticossos inclosos en els criteris, el FR IgM i els ACPA IgG. Només representaven el 8% dels pacients, molt inferior al 30% que s'ha descrit (115). Una altra de les limitacions importants va ser el baix nombre d'homes inclosos. Tot i que l'AR és més prevalent en dones, els homes estan més afectats per la MPID. A més, durant el seguiment dels pacients (4 anys) només un pacient del grup d'AR sense MPID la va desenvolupar, i això no va permetre analitzar els factors de risc associats a la nova aparició d'aquesta afectació extraarticular. A banda, una altra limitació és que l'estudi és

transversal, els pacients no es van incloure ni en el moment del diagnòstic de l'AR, ni en el moment del diagnòstic de la MPID, sinó de manera consecutiva independentment dels diagnòstics. Finalment, el període de seguiment inclou la pandèmia de la COVID-19, i per això es van excloure els pacients que van morir en el context o la sospita d'una infecció per SARS-CoV-2. Tot i que la taxa de mortalitat era semblant a la descrita prèviament en aquest tipus de pacients, el nombre absolut de pacients que van morir va ser baix. També cal remarcar que, tot i que la prevalença de MPID associada a AR en la regió mediterrània és més elevada que en altres regions descrites, el grup d'AR i MPID només representava 37 pacients, fet que limita els resultats de les anàlisis dins d'aquest grup.

4. Projectes de futur

Per tal de confirmar i assentar els resultats d'aquests treballs, és imprescindible la inclusió de nous pacients. A més, la inclusió de pacients que s'ha dut a terme és conseqüència de la realitat assistencial, tant clínica com del laboratori, del nostre hospital. En els treballs d'aquesta tesi, els pacients no han estat inclosos en el moment del diagnòstic sinó durant el seguiment o amb mostres retrospectives, per tant, en el futur, caldria plantejar estudis prospectius. A més, és complicat saber quina influència té el règim terapèutic dels pacients sobre els biomarcadors estudiats, per això, incloure pacients amb un diagnòstic recent i amb poca càrrega farmacològica seria de gran interès. Finalment, creiem que la modificació dels punts de talls de les proves disponibles al laboratori, amb l'objectiu d'identificar grups de pacients amb més activitat o pitjor pronòstic, constitueix una eina de senzilla i de ràpida aplicació al catàleg de proves disponibles que encara no ha estat estudiada a fons. En darrer lloc, amb el desenvolupament de l'era de les òmiques, és imprescindible l'anàlisi de diferents paràmetres simultàniament, ja que és probable que el risc es trobi augmentat amb la coexistència de més d'un biomarcador.

En el cas del LES, la inclusió d'un grup de pacients poc després del debut de la malaltia, un grup de pacients amb afectació renal en remissió i un grup de pacients sense afectació renal, permetria avaluar quin d'aquests

grups pot beneficiar-se més dels resultats de l'ELISpot. A banda i donat que els resultats de l'ELISpot ja s'han associat a l'aparició de brots al cap d'un any, s'hauria de valorar la incorporació de l'ELISpot a la pràctica clínica habitual del laboratori. Caldria però, estratificar quins pacients són els millors candidats per a l'anàlisi d'aquest biomarcador, ja que és una prova que, de moment, no pot fer-se a gran escala. A més, seria de gran interès, conèixer l'evolució de la població de cèl·lules B específiques d'antigen al llarg de l'evolució de la malaltia. D'altra banda, alguns estudis recents han descrit l'anàlisi de cèl·lules B específiques mitjançant tècniques de citometria de flux (207,261–263), per això seria interessant comparar-ne els resultats amb els de l'ELISpot, ja que la seva escalabilitat és molt més senzilla. Encara que amb aquest mètode també es detectarien limfòcits B específics d'antigen, però amb funció reguladora o sense capacitat funcional de produir anticossos.

Pel que fa als estudis en ES, l'estudi del potencial paper de l'isotip IgA en cohorts prospectives més grans i amb mostres de sèrum recollides de forma seriada podria descriure l'aparició seqüencial o simultània dels diferents isotips d'autoanticossos. Si, a més, aquests estudis inclouen pacients des de les primeres manifestacions de la malaltia (fenomen de Raynaud), se'n podrà descriure el paper diagnòstic i la seva possible associació al desenvolupament de diferents fenotips clínics d'ES (tant cutanis com orgànics).

En relació amb l'AR, cal incloure grups de pacients amb diagnòstic d'AR, però seronegatius per a un o als dos autoanticossos inclosos en els criteris. Això permetrà conèixer la capacitat diagnòstica d'aquests nous biomarcadors en absència dels clàssics. La inclusió de pacients amb un diagnòstic d'AR de diagnòstic recent i amb poca afectació articular, així com un seguiment més llarg, permetrà conèixer el valor pronòstic dels biomarcadors per a l'evolució de l'AR o l'aparició de manifestacions extraarticulars com la MPID. En aquest sentit, la inclusió de determinacions seriadades pot afinar encara més la relació entre la detecció del biomarcador i l'aparició d'una determinada manifestació clínica. A més l'estudi de noves proteïnes, associades al dany alveolar o a l'afectació pulmonar (SP-D, entre d'altres...) (157), o d'altres autoanticossos dirigits contra proteïnes

modificades o els enzims encarregats de la seva modificació (anti-CarP, anti-PAD, entre d'altres) (234,235,264,265) pot ser d'interès.

En general, afegit a l'estudi dels limfòcits B o dels autoanticossos que produeixen, no hem d'oblidar el paper de la resposta T associada. Per exemple en l'ELISpot, cal ser conscients que la col·laboració entre la resposta T i la resposta B és gairebé imprescindible per a la producció d'autoanticossos. Tot i això, la funció dels limfòcits T en la patogènia del LES i l'impacte en el curs clínic encara és força desconeguda. Els possibles estudis enfocats a la cerca dels antígens diana que reconeixen els limfòcits T, tant els CD4 com els CD8, poden augmentar el coneixement de la patogènia de les MA, proposar noves dianes terapèutiques i, fins i tot, estratègies per revertir la pèrdua de tolerància específica envers aquells antígens.

Finalment, el càlcul de les raons de versemblança per a diferents afectacions i biomarcadors han de validar-se en cohorts semblants a les poblacions que s'atenen, i són imprescindibles per tal de millorar la interpretació dels resultats del laboratori d'immunologia (266,267). En aquest sentit, ja trobem algunes iniciatives en grups europeus per a la interpretació de resultats d'ACPA en AR (99,268,269) i d'anti-mieloperoxidasa i anti-proteïnasa 3 en vasculitis ANCA positives (270–272). Aquests abordatges però, s'han de realitzar de forma local per tal de reflectir el mètode de laboratori i la població que s'atén a cada centre. Una altra opció seria incloure als pacients en bases de dades públiques, amb l'objectiu de configurar les cohorts en funció de determinades característiques demogràfiques i calcular les raons de versemblança específiques dels mètodes emprats.





VII. Conclusions



Les conclusions derivades dels diferents estudis publicats i inclosos en aquesta tesi doctoral són:

Estudi 1: Quantificació dels limfòcits B productors d'autoanticossos anti-dsDNA en pacients amb Lupus Eritematos Sistèmic (LES)

1. La quantificació de les cèl·lules productores d'autoanticossos anti-dsDNA en sang perifèrica, mitjançant el mètode d'ELISpot, pot proporcionar informació útil, diferent i complementària a la qual s'obté amb la quantificació habitual dels autoanticossos anti-dsDNA en el sèrum dels pacients amb LES.
2. En la nostra cohort de pacients amb LES, els resultats que s'obtenen amb aquest mètode ELISpot, en establir un punt de tall d'activitat, permeten la identificació de pacients amb activitat clínica amb la millor combinació de sensibilitat i especificitat.
3. Els resultats de l'ELISpot per sobre del punt de tall d'activitat són un factor de risc en la predicció de l'aparició d'un brot de la malaltia, en el curs de l'any següent. Aquesta capacitat de predicció millora quan es combinen els resultats de l'ELISpot amb l'avaluació del sistema del complement.

Estudi 2: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'estratificació dels pacients amb Esclerosi Sistèmica (ES)

4. En la nostra cohort de pacients amb ES, un 72.6% dels pacients que presenten positivitat d'isotip IgG per algun dels tres autoanticossos inclosos en els criteris de classificació, també presenten simultàniament positivitat d'isotip IgA per a la mateixa especificitat d'autoanticòs.
5. A la cohort, un 19.6% dels pacients presenten autoanticossos anti-Ro52, però només un 36.8% d'aquests són dobles positius per l'isotip IgG i l'IgA.
6. En aquest estudi, el fenotip d'ES *sine scleroderma* s'associa, per una banda, a la presència d'ACA IgG aïllat (negatiu per IgA) i, d'altra banda, i de forma independent, a la presència d'anti-Ro52 IgG i IgA.
7. Algunes manifestacions clíniques de l'ES, com la MPID, les telangièctasis, les úlceres digitals i l'artritis, tendeixen a tenir una prevalença més alta segons el perfil d'autoanticossos, però no assoleixen la significació estadística a la nostra cohort.

Estudi 3: Augment del nombre de biomarcadors disponibles per al diagnòstic i l'avaluació pronòstica dels pacients amb Artritis Reumatoide

8. A la cohort d'estudi, la prevalença del FR IgG, FR IgA, ACPA IgM i ACPA IgA, CEP-1 IgG, CEP-1 IgA i KL-6, és més alta en el grup d'AR i MPID, però aquestes diferències només són significatives per al FR IgG i el KL-6. A més, els títols de FR IgG i KL-6 són més elevats en el grup d'AR amb MPID.
9. Per altra banda, la positivitat del FR IgM, ACPA IgG, RA33 IgM, RA33 IgG i RA33 IgA és més alta el grup d'AR sense MPID, però no arriba a la significació estadística.
10. La positivitat del FR IgG, la positivitat del KL-6, l'activitat clínica de l'AR, un IMC per sobre de 25 i el temps d'evolució de l'AR mostren una associació positiva amb la presència de MPID, mentre que l'edat al moment del diagnòstic d'AR mostra una associació negativa.
11. El patró NIU de la MPID està associat a la presència de FR IgG i ACPA IgG, en pacients amb AR. Encara que els ACPA IgG no tenen la capacitat de diferenciar el grup d'AR amb MPID del grup d'AR sense MPID.
12. Els factors de risc associats a la mortalitat a quatre anys són la presència de MPID, la positivitat del KL-6 i el temps d'evolució de l'AR.

VIII. Bibliografia

1. Stranford SA, Owen JA, Punt J, Jones PP. Kuby Immunology. 8th ed. Mc Graw Hill Education; 2022. 798 p.
2. Murphy KM, Weaver C, Berg LJ. Janeway's Immunobiology. 10th ed. W. W. Norton & Company; 2022. 960 p.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Elsevier; 2021. 600 p.
4. Pertiwi KR, de Boer OJ, Mackaaij C, Pabittei DR, de Winter RJ, Li X, et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *J Pathol*. 2019 Apr 25;247(4):505–12.
5. Song W, Ye J, Pan N, Tan C, Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Tied to Rheumatoid Arthritis: Points to Ponder. *Front Immunol*. 2021;11(January):1–10.
6. Defendi F, Thielens NM, Clavarino G, Cesbron JY, Dumestre-Pérard C. The Immunopathology of Complement Proteins and Innate Immunity in Autoimmune Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Apr 13;58(2):229–51.
7. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan 14;343(1):227–35.
8. Steele EJ, Lindley RA. Regulatory T cells and co-evolution of allele-specific MHC recognition by the TCR. *Scand J Immunol*. 2020 Mar 17;91(3).
9. Usharauli D, Kamala T. Could cross-reactivity rescue Foxp3+ regulatory T cell precursors from thymic deletion? *Scand J Immunol*. 2021 Jan 10;93(1).
10. Charaix J, Borelli A, Santamaria JC, Chasson L, Giraud M, Sergé A, et al. Recirculating Foxp3+ regulatory T cells are restimulated in the thymus under Aire control. *Cell Mol Life Sci*. 2022 Jul 9;79(7):355.
11. Antiochos B, Rosen A. Mechanisms of Autoimmunity. Fifth Edit. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier Ltd; 2019. 677-684.e1 p.
12. Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol*. 2004 Jun 23;5(6):645–50.
13. Kim SJ, Caton M, Wang C, Khalil M, Zhou ZJ, Hardin J, et al. Increased IL-12 inhibits B cells' differentiation to germinal center cells and promotes differentiation to short-lived plasmablasts. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2437–48.
14. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev*. 2010 Sep 19;237(1):140–59.
15. Liu Z, Zou YR, Davidson A. Plasma cells in systemic lupus

- erythematosus: The long and short of it all. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):588–91.
16. Yap DYH, Chan TM. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis—role in pathogenesis and effect of immunosuppressive treatments. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):1–18.
17. Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis*. 2013;2013:1–17.
18. Conrad N, Misra S, Verbakel JY, Verbeke G, Molenberghs G, Taylor PN, et al. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet*. 2023 Jun;401(10391):1878–90.
19. Souyris M, Cenac C, Azar P, Daviaud D, Canivet A, Grunenwald S, et al. TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Sci Immunol*. 2018;3(19):1–11.
20. Witebsky E. CHRONIC THYROIDITIS AND AUTOIMMUNIZATION. *J Am Med Assoc*. 1957 Jul 27;164(13):1439.
21. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*. 1993 Sep;14(9):426–30.
22. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2011 Dec;365(22):2110–21.
23. Zhang J, Zhu Q, Meng F, Lei H, Zhao Y. Association study of TLR-9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Northern Chinese Han population. *Gene*. 2014;533(1):385–8.
24. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RAA, Shlomchik MJ. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity*. 2006;25(3):417–28.
25. Anders HJ, Saxena R, Zhao M hui, Parodis I, Salmon JE, Mohan C. Lupus nephritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;6(1).
26. Jia X, Tan L, Chen S, Tang R, Chen W. Monogenic lupus: Tracing the therapeutic implications from single gene mutations. *Clin Immunol*. 2023 Sep;254(April):109699.
27. Wobma H, Janssen E. Expanding IPEX: Inborn Errors of Regulatory T Cells. *Rheum Dis Clin North Am*. 2023 Nov;49(4):825–40.
28. Karaatmaca B, Cagdas D, Esenboga S, Erman B, Tan C, Ozgur TT, et al. Heterogeneity in RAG 1/2 Deficiency: 35 Cases From A Single Center. *Clin Exp Immunol*. 2023 Sep 19;
29. Wysocki T, Olesińska M, Paradowska-Gorycka A. Current Understanding of an Emerging Role of HLA-DRB1 Gene in Rheumatoid Arthritis—From Research to Clinical Practice. *Cells*. 2020 May

- 2;9(5):1127.
30. Alevizos MK, Danoff SK, Pappas DA, Lederer DJ, Johnson C, Hoffman EA, et al. Assessing predictors of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease using quantitative lung densitometry. *Rheumatol*. 2022 Jul 1;61(7):2792–804.
 31. Aggarwal R, Ringold S, Khanna D, Neogi T, Johnson SR, Miller A, et al. Distinctions Between Diagnostic and Classification Criteria? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015 Jul;67(7):891–7.
 32. Han S, Zhuang H, Shumyak S, Yang L, Reeves WH. Mechanisms of autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2015;6(MAY):1–7.
 33. Rees F, Doherty M, Grainge MJ, Lanyon P, Zhang W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: A systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology*. 2017;56(11):1945–61.
 34. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, Van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(June):1–22.
 35. Teruel M, Alarcón-Riquelme ME. The genetic basis of systemic lupus erythematosus : What are the risk factors and what have we learned. *J Autoimmun*. 2016;74:161–75.
 36. Hirabayashi Y. Apoptosis and Medicine. Ntuli T, editor. *Apoptosis and Medicine*. InTech; 2012. 49–66 p.
 37. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(10):565–79.
 38. Moulton VR, Holcomb DR, Zajdel MC, Tsokos GC. Estrogen upregulates cyclic AMP response element modulator α expression and downregulates interleukin-2 production by human T lymphocytes. *Mol Med*. 2012;18(3):370–8.
 39. Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naïve B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2703–8.
 40. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271–7.
 41. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(9):1151–9.
 42. Zoma A. Musculoskeletal involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004 Nov 2;13(11):851–3.

43. Urowitz MB, Gladman DD, Ibañez D, Sanchez-Guerrero J, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. American College of Rheumatology Criteria at Inception, and Accrual over 5 Years in the SLICC Inception Cohort. *J Rheumatol*. 2014 May;41(5):875–80.
44. Aranow C, Diamond B, Mackay M. Systemic Lupus Erythematosus. Fifth Edit. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier Ltd; 2019. 685-704.e1 p.
45. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: A comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(5):299–308.
46. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. *Am J Med*. 2002 Jun;112(9):726–9.
47. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific Incidence Rates of Myocardial Infarction and Angina in Women with Systemic Lupus Erythematosus: Comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1997 Mar 1;145(5):408–15.
48. Mittoo S, Fell C. Pulmonary Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Respir Crit Care Med*. 2014 Mar 25;35(02):249–54.
49. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen Is a Primary Site for Activation of Platelet-Reactive T and B Cells in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *J Immunol*. 2002;168(7):3675–82.
50. Carli L, Tani C, Vagnani S, Signorini V, Mosca M. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia in systemic lupus erythematosus: Prevalence and clinical impact—A systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2015 Oct;45(2):190–4.
51. Michel M, Lee K, Piette J, Fromont P, Schaeffer A, Bierling P, et al. Platelet autoantibodies and lupus-associated thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2002 Nov 30;119(2):354–8.
52. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 2006;85(3):147–56.
53. To CH, Petri M. Is antibody clustering predictive of clinical subsets and damage in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum*. 2005;52(12):4003–10.
54. Singh S, Saxena R. Lupus Nephritis. *Am J Med Sci*. 2009 Jun 1;337(6):451–60.
55. Pons-Estel GJ, Serrano R, Plasín MA, Espinosa G, Cervera R. Epidemiology and management of refractory lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2011;10(11):655–63.
56. Hanly JG, O’Keeffe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C,

- et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: Results from an international inception cohort study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;55(2):252–62.
57. Rother N, Van der Vlag J. Disturbed T cell signaling and altered Th17 and regulatory T cell subsets in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2015;6(NOV):1–10.
58. Kim SJ, Lee K, Diamond B. Follicular helper T cells in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2018;9(AUG):1–8.
59. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM, Davis LS. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(1):i55–66.
60. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(6):329–41.
61. Gandino IJ, Scolnik M, Bertiller E, Scaglioni V, Catoggio LJ, Soriano ER. Complement levels and risk of organ involvement in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med*. 2017;4(1):1–5.
62. Neves A, Viveiros L, Venturelli V, Isenberg DA. Promising Experimental Treatments for Lupus Nephritis: Key Talking Points and Potential Opportunities. *Res Reports Urol*. 2023 Jul;Volume 15:333–53.
63. Taddeo A, Khodadadi L, Voigt C, Mumtaz IM, Cheng Q, Moser K, et al. Long-lived plasma cells are early and constantly generated in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):1–12.
64. Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D, et al. Short-lived Plasmablasts and Long-lived Plasma Cells Contribute to Chronic Humoral Autoimmunity in NZB/W Mice. *J Exp Med*. 2004;199(11):1577–84.
65. Hiepe F, Radbruch A. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(4):232–40.
66. Huang X, Chen W, Ren G, Zhao L, Guo J, Gong D, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for refractory lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(5):719–27.
67. Sciascia S, Cuadrado MJ, Khamashta M, Roccatello D. Renal involvement in antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(5):279–89.
68. Turner-Stokes T, Wilson HR, Morreale M, Nunes A, Cairns T, Cook HT, et al. Positive antineutrophil cytoplasmic antibody serology in patients with lupus nephritis is associated with distinct histopathologic features on renal biopsy. *Kidney Int*. 2017;92(5):1223–31.
69. Font J, Torras A, Cervera R, Darnell A, Revert L, Ingelmo M. Silent

- renal disease in systemic lupus erythematosus. *Clin Nephrol*. 1987 Jun;27(6):283–8.
70. Contreras G, Pardo V, Cely C, Borja E, Hurtado A, De La Cuesta C, et al. Factors associated with poor outcomes in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2005;14(11):890–5.
 71. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(April).
 72. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017;390(10103):1685–99.
 73. Varga J, Wigley FM. Scleroderma–Systemic Sclerosis. Fifth Edit. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier Ltd; 2019. 743–755.e1 p.
 74. Rubio-Rivas M, Corbella X, Guillén-del-Castillo A, Tolosa Vilella C, Colunga Argüelles D, Argibay A, et al. Spanish scleroderma risk score (RESCLESCORE) to predict 15-year all-cause mortality in scleroderma patients at the time of diagnosis based on the RESCLE cohort: Derivation and internal validation. *Autoimmun Rev*. 2020;19(5):102507.
 75. Asano Y. The pathogenesis and treatment of systemic sclerosis - An understanding based on a disease-specific pathological cascade and organ-specific modifying factors. *Nishinihon J Dermatology*. 2020;82(2):75–80.
 76. Zanin-Silva DC, Santana-Gonçalves M, Kawashima-Vasconcelos MY, Oliveira MC. Management of Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis: Current and Developing Strategies. *Front Med*. 2021 Dec 22;8(December):1–14.
 77. LeRoy EC, Medsger J. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573–6.
 78. Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Plá V, Tolosa-Vilella C, Espinosa-Garriga G, Ramos-Casals M, Campillo-Grau M, et al. Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Clinical Pattern According to Cutaneous Subsets and Immunological Status. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Jun;41(6):789–800.
 79. Patterson KA, Roberts-Thomson PJ, Lester S, Tan JA, Hakendorf P, Rischmueller M, et al. Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Dec;67(12):3234–44.
 80. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum*. 2013 Nov;65(11):2737–47.
 81. Mierau R, Moinszadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M,

- Reichenberger F, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R172.
82. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jan 12;66(6):754–63.
83. Sobanski V, Giovannelli J, Allanore Y, Riemekasten G, Airò P, Vettori S, et al. Phenotypes Determined by Cluster Analysis and Their Survival in the Prospective European Scleroderma Trials and Research Cohort of Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Sep 12;71(9):1553–70.
84. Lescoat A, Huscher D, Schoof N, Airò P, de Vries-Bouwstra J, Riemekasten G, et al. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease in the EUSTAR database: analysis by region. *Rheumatology*. 2023 Jun 1;62(6):2178–88.
85. Meyer O, De Chaisemartin L, Nicaise-Roland P, Cabane J, Tubach F, Dieude P, et al. Anti-RNA polymerase III antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of French patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study. *J Rheumatol*. 2010 Jan;37(1):125–30.
86. Patterson KA, Roberts-Thomson PJ, Lester S, Tan JA, Hakendorf P, Rischmueller M, et al. Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Dec 25;67(12):3234–44.
87. Graf SW, Hakendorf P, Lester S, Patterson K, Walker JG, Smith MD, et al. South Australian Scleroderma Register: autoantibodies as predictive biomarkers of phenotype and outcome. *Int J Rheum Dis*. 2012 Feb;15(1):102–9.
88. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2008 Jan 17;158(3):487–95.
89. Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi MC, et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):114–20.
90. Vanthuyne M, Smith V, De Langhe E, Van Praet J, Arat S, Depresseux G, et al. The Belgian Systemic Sclerosis Cohort: correlations between disease severity scores, cutaneous subsets, and autoantibody profile. *J Rheumatol*. 2012 Nov;39(11):2127–33.
91. Sánchez-Cano D, Ortego-Centeno N, Callejas JL, Fonollosa Plá V, Ríos-Fernández R, Tolosa-Vilella C, et al. Interstitial lung disease in

- systemic sclerosis: data from the spanish scleroderma study group. *Rheumatol Int.* 2018;38(3):363–74.
92. Lazzaroni MG, Cavazzana I, Colombo E, Dobrota R, Hernandez J, Hesselstrand R, et al. Malignancies in Patients with Anti-RNA Polymerase III Antibodies and Systemic Sclerosis: Analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research Cohort and Possible Recommendations for Screening. *J Rheumatol.* 2017 May;44(5):639–47.
 93. Ioannidis JPA, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: An international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med.* 2005 Jan;118(1):2–10.
 94. Lescoat A, Huang S, Carreira PE, Siegert E, de Vries-Bouwstra J, Distler JHW, et al. Cutaneous Manifestations, Clinical Characteristics, and Prognosis of Patients With Systemic Sclerosis Sine Scleroderma. *JAMA Dermatology.* 2023 Aug 1;159(8):837.
 95. Carbonell C, Marcos M, Guillén-del-Castillo A, Rubio-Rivas M, Argibay A, Marín-Ballvé A, et al. Standardized incidence ratios and risk factors for cancer in patients with systemic sclerosis: Data from the Spanish Scleroderma Registry (RESCLE). *Autoimmun Rev.* 2022 Oct;21(10):103167.
 96. Cope AP. Rheumatoid Arthritis. Fifth Edit. *Clinical Immunology: Principles and Practice.* Elsevier Ltd; 2019. 705-721.e1 p.
 97. Reed E, Hedström AK, Hansson M, Mathsson-Alm L, Brynedal B, Saevarsdottir S, et al. Presence of autoantibodies in “seronegative” rheumatoid arthritis associates with classical risk factors and high disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):1–11.
 98. Sieghart D, Platzer A, Studenic P, Alasti F, Grundhuber M, Swiniarski S, et al. Determination of Autoantibody Isotypes Increases the Sensitivity of Serodiagnostics in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2018 Apr 24;9(APR).
 99. Van Hoovels L, Studenic P, Sieghart D, Steiner G, Bossuyt X, Rönnelid J. Impact of autoimmune serology test results on RA classification and diagnosis. *J Transl Autoimmun.* 2022;5.
 100. Volkov M, van Schie KA, van der Woude D. Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol Rev.* 2020;294(1):148–63.
 101. Kadura S, Raghu G. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease: Manifestations and current concepts in pathogenesis and management. *Eur Respir Rev.* 2021;30(160).
 102. Brito Y, Glassberg MK, Ascherman DP. Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease: Current Concepts. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(12).
 103. Wu EK, Ambrosini RD, Kottmann RM, Ritchlin CT, Schwarz EM, Rahimi

- H. Reinterpreting Evidence of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease to Understand Etiology. *Curr Rheumatol Rev*. 2019 Jan;
104. Schönland SO, Lopez C, Widmann T, Zimmer J, Bryl E, Goronzy JJ, et al. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Nov 11;100(23):13471–6.
 105. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Dec 7;6(12):727–30.
 106. Huizinga TWJ, Amos CI, van der Helm-van Mil AHM, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov;52(11):3433–8.
 107. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3183–94.
 108. Klarenbeek PL, de Hair MJH, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveldt REE, van de Sande MGH, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):1088–93.
 109. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 27;5(178).
 110. McCarthy CG, Saha P, Golonka RM, Wenceslau CF, Joe B, Vijay-Kumar M. Innate Immune Cells and Hypertension: Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Compr Physiol*. 2021 Feb 12;1575–89.
 111. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):380–6.
 112. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Immunol*. 2008 Apr 1;26(1):651–75.
 113. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*. 2012 May 1;122(5):1791–802.
 114. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American

- College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2569–81.
115. De Winter LM, Hansen WLJ, van Steenberg HW, Geusens P, Lenaerts J, Somers K, et al. Autoantibodies to two novel peptides in seronegative and early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2016 Aug;55(8):1431–6.
 116. Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, van Tuyl L, van Schaardenburg D. Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug 1;70(8):1468–70.
 117. Le Loët X, Nicolau J, Boumier P, Daragon A, Mejjad O, Pouplin S, et al. Validation of the 2010-ACR/EULAR – classification criteria using newly EULAR-defined erosion for rheumatoid arthritis on the very early arthritis community-based (VERA) cohort. *Jt Bone Spine*. 2015 Jan;82(1):38–41.
 118. Farquhar H, Beckert N, Beckert L, Edwards A, Matteson E, Frampton C, et al. Survival of adults with rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease - A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2023 Jun;60:152187.
 119. Haga HJ, Naderi Y, Moreno AM, Peen E. A study of the prevalence of sicca symptoms and secondary Sjögren's syndrome in patients with rheumatoid arthritis, and its association to disease activity and treatment profile. *Int J Rheum Dis*. 2012 Jun;15(3):284–8.
 120. Kim H, Cho SK, Kim HW, Han J, Kim Y, Hwang KG, et al. The Prevalence of Sjögren's Syndrome in Rheumatoid Arthritis Patients and Their Clinical Features. *J Korean Med Sci*. 2020;35(45):1–11.
 121. Harrold LR, Shan Y, Rebello S, Kramer N, Connolly SE, Alemao E, et al. Prevalence of Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis in the USA: an observational study from the Corrona registry. *Clin Rheumatol*. 2020 Jun 4;39(6):1899–905.
 122. Carmona L, González-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M, Tena X, Sanmartí R. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis*. 2003 Sep 1;62(9):897–900.
 123. Wijsenbeek M, Suzuki A, Maher TM. Interstitial lung diseases. *Lancet*. 2022 Sep;400(10354):769–86.
 124. Wallis A, Spinks K. The diagnosis and management of interstitial lung diseases. *BMJ*. 2015 May 7;350(may07 17):h2072–h2072.
 125. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):733–48.
 126. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer

- DJ, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44–68.
127. Kreuter M, Herth FJF, Wacker M, Leidl R, Hellmann A, Pfeifer M, et al. Exploring Clinical and Epidemiological Characteristics of Interstitial Lung Diseases: Rationale, Aims, and Design of a Nationwide Prospective Registry - The EXCITING-ILD Registry. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
128. Joy GM, Arbiv OA, Wong CK, Lok SD, Adderley NA, Dobosz KM, et al. Prevalence, imaging patterns and risk factors of interstitial lung disease in connective tissue disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev*. 2023 Mar 31;32(167):220210.
129. Jeganathan N, Sathananthan M. Connective Tissue Disease-Related Interstitial Lung Disease: Prevalence, Patterns, Predictors, Prognosis, and Treatment. *Lung*. 2020;198(5):735–59.
130. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ*. 2016 Feb 24;352:h6819.
131. Luppi F, Sebastiani M, Salvarani C, Bendstrup E, Manfredi A. Acute exacerbation of interstitial lung disease associated with rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2022;18(2):85–96.
132. Manfredi A, Cassone G, Luppi F, Atienza-Mateo B, Cavazza A, Sverzellati N, et al. Rheumatoid arthritis related interstitial lung disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2021 May 4;17(5):485–97.
133. Hyldgaard C, Hilberg O, Pedersen AB, Ulrichsen SP, Løkke A, Bendstrup E, et al. A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: Comorbidity and mortality. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(10):1700–6.
134. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2017;389(10082):1941–52.
135. Hyldgaard C, Bendstrup E, Pedersen AB, Pedersen L, Ellingsen T. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: Survival patterns in a population-based cohort. *J Clin Med*. 2021;10(21).
136. Wells AU, Denton CP. Interstitial lung disease in connective tissue disease - Mechanisms and management. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(12):728–39.
137. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby T V., Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(12):1581–6.
138. Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, Webb WR, Ryu JH, Van Uden JH, et al. Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J*. 2010 Jun;35(6):1322–8.
139. Tsuchiya Y, Takayanagi N, Sugiura H, Miyahara Y, Tokunaga D,

- Kawabata Y, et al. Lung diseases directly associated with rheumatoid arthritis and their relationship to outcome. *Eur Respir J*. 2011;37(6):1411–7.
140. Joo HP, Dong SK, Park IN, Se JJ, Kitaichi M, Nicholson AG, et al. Prognosis of fibrotic interstitial pneumonia: Idiopathic versus collagen vascular disease-related subtypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(7):705–11.
141. Cottin V. Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review. *Respirology*. 2016;21(2):245–58.
142. Kolb M, Bondue B, Pesci A, Miyazaki Y, Song JW, Bhatt NY, et al. Acute exacerbations of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev*. 2018;27(150):1–8.
143. Park IN, Kim DS, Shim TS, Lim CM, Lee S Do, Koh Y, et al. Acute Exacerbation of Interstitial Pneumonia Other Than Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*. 2007 Jul;132(1):214–20.
144. Suda T, Kaida Y, Nakamura Y, Enomoto N, Fujisawa T, Imokawa S, et al. Acute exacerbation of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Respir Med*. 2009 Jun;103(6):846–53.
145. Manfredi A, Sebastiani M, Cerri S, Vacchi C, Tonelli R, Casa G Della, et al. Acute exacerbation of interstitial lung diseases secondary to systemic rheumatic diseases: A prospective study and review of the literature. *J Thorac Dis*. 2019;11(4):1621–8.
146. Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, Jenkins G, Kondoh Y, Lederer DJ, et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Aug 1;194(3):265–75.
147. Probst CK, Montesi SB, Medoff BD, Shea BS, Knipe RS. Vascular permeability in the fibrotic lung. *Eur Respir J*. 2020 Jul;56(1):1900100.
148. Cerro Chiang G, Parimon T. Understanding Interstitial Lung Diseases Associated with Connective Tissue Disease (CTD-ILD): Genetics, Cellular Pathophysiology, and Biologic Drivers. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 26;24(3):2405.
149. Johnson C, Rosen P, Lloyd T, Horton M, Christopher-Stine L, Oddis C V., et al. Exploration of the MUC5B promoter variant and ILD risk in patients with autoimmune myositis. *Respir Med*. 2017;130:52–4.
150. Borie R, Crestani B, Dieude P, Nunes H, Allanore Y, Kannengiesser C, et al. The MUC5B Variant Is Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis but Not with Systemic Sclerosis Interstitial Lung Disease in the European Caucasian Population. *PLoS One*. 2013;8(8):1–6.
151. Juge PA, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2018 Dec 6;379(23):2209–19.
152. Muruganandam M, Ariza-Hutchinson A, Patel RA, Sibbitt Jr WL.

- Biomarkers in the Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Systemic Sclerosis. *J Inflamm Res.* 2023 Oct;Volume 16(September):4633–60.
153. Elhai M, Hoffmann-Vold AM, Avouac J, Pezet S, Cauvet A, Leblond A, et al. Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* 2019 Jun 26;71(6):972–82.
 154. Kishaba T. Evaluation and management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Investig.* 2019 Jul;57(4):300–11.
 155. Stock CJW, Hoyles RK, Daccord C, Kokosi M, Visca D, De Lauretis A, et al. Serum markers of pulmonary epithelial damage in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease and disease progression. *Respirology.* 2020;1–8.
 156. Lee YS, Kim HC, Lee BY, Lee CK, Kim MY, Jang SJ, et al. The value of biomarkers as predictors of outcome in patients with rheumatoid arthritis-Associated usual interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis.* 2016;33(3):216–23.
 157. Elhai M, Avouac J, Allanore Y. Circulating lung biomarkers in idiopathic lung fibrosis and interstitial lung diseases associated with connective tissue diseases: Where do we stand? *Semin Arthritis Rheum.* 2020 Jun;50(3):480–91.
 158. Avouac J, Cauvet A, Steelandt A, Shirai Y, Elhai M, Kuwana M, et al. Improving risk-stratification of rheumatoid arthritis patients for interstitial lung disease. *PLoS One.* 2020 May 1;15(5).
 159. Florescu A, Gherghina FL, Muşetescu AE, Pădureanu V, Roşu A, Florescu MM, et al. Novel Biomarkers, Diagnostic and Therapeutic Approach in Rheumatoid Arthritis Interstitial Lung Disease— A Narrative Review. Vol. 10, *Biomedicines.* MDPI; 2022.
 160. Martinović Kaliterna D, Petrić M. Biomarkers of skin and lung fibrosis in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(11):1215–23.
 161. Volkmann ER, Tashkin DP, Kuwana M, Li N, Roth MD, Charles J, et al. Pneumoproteins KL-6 and CCL-18 Predict Progression of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2019 Jun 24;0–3.
 162. Zhou A, Tang H, Peng W, Wang Y, Tang X, Yang H, et al. KL-6 levels in the connective tissue disease population: typical values and potential confounders-a retrospective, real-world study. *Front Immunol.* 2023 Jun 20;14(June):1098602.
 163. Kim HC, Choi KH, Jacob J, Song JW. Prognostic role of blood KL-6 in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. Kuwana M, editor. *PLoS One.* 2020 Mar 12;15(3):e0229997.
 164. Lee JS, Lee EY, Ha YJ, Kang EH, Lee YJ, Song YW. Serum KL-6 levels reflect the severity of interstitial lung disease associated with

- connective tissue disease. *Arthritis Res Ther*. 2019 Dec 14;21(1):58.
165. Li Y, Jin L, Chen T. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *Biomed Res Int*. 2020 Jan 8;2020:1–6.
 166. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol*. 2011 Nov;4(6):590–7.
 167. Vidarsson G, van der Pol WL, van den Elsen JMH, Vilé H, Jansen M, Duijs J, et al. Activity of Human IgG and IgA Subclasses in Immune Defense Against *Neisseria meningitidis* Serogroup B. *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6250–6.
 168. Russell MW, Reinholdt J, Kilian M. Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Faba fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur J Immunol*. 1989 Dec;19(12):2243–9.
 169. Reyes-Ruiz A, Dimitrov JD. Microbial symphony orchestrated by mucosal IgA. *Cell Mol Immunol*. 2022 Jan 7;19(4):456–7.
 170. Kårhus LL, Skaaby T, Madsen AL, Thuesen BH, Schwarz P, Rumessen JJ, et al. The association of celiac disease and allergic disease in a general adult population. *United Eur Gastroenterol J*. 2019 Feb;7(1):78–89.
 171. Song Y, Huang X, Yu G, Qiao J, Cheng J, Wu J, et al. Pathogenesis of IgA Vasculitis: An Up-To-Date Review. *Front Immunol*. 2021 Nov 9;12:771619.
 172. Serrano M, Morán L, Martinez-Flores JA, Mancebo E, Pleguezuelo D, Cabrera-Marante O, et al. Immune Complexes of Beta-2-Glycoprotein I and IgA Antiphospholipid Antibodies Identify Patients With Elevated Risk of Thrombosis and Early Mortality After Heart Transplantation. *Front Immunol*. 2019 Dec 23;10:2891.
 173. König IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp M V. What is precision medicine? *Eur Respir J*. 2017 Oct 19;50(4):1700391.
 174. Knitza J, Knevel R, Raza K, Bruce T, Eimer E, Gehring I, et al. Toward earlier diagnosis using combined ehealth tools in rheumatology: The joint pain assessment scoring tool (JPAST) Project. *JMIR mHealth uHealth*. 2020;8(5):1–12.
 175. Mahler M, Martinez-Prat L, Sparks JA, Deane KD. Precision medicine in the care of rheumatoid arthritis: Focus on prediction and prevention of future clinically-apparent disease. *Autoimmun Rev*. 2020;19(5):102506.
 176. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243(3):213–21.
 177. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, et al. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? *Front Immunol*. 2018;9(MAR):1–20.
 178. Khan QA, Khan T, Abdi P, Farkouh C, Anthony M, Hadi FA, et al. Diagnostic Dilemma of ANA-negative Pediatric Systemic Lupus

- Erythematosus in a South Asian Female. *Clin Med Insights Case Reports*. 2023 Jan 15;16:117954762311743.
179. Baharudin R, Idris NS, Muhammad J, Abdullah WNH. A Case Report of Male Systemic Lupus Erythematosus with Antinuclear Antibodies-Negative: A Challenging Diagnosis. *Korean J Fam Med*. 2022 Mar 20;43(2):150–4.
 180. Alkema W, Koenen H, Kersten BE, Kaffa C, Dinnissen JWB, Damoiseaux JGMC, et al. Autoantibody profiles in systemic sclerosis; a comparison of diagnostic tests. *Autoimmunity*. 2021 Apr;54(3):148–55.
 181. Nihtyanova SI, Sari A, Harvey JC, Leslie A, Derrett-Smith EC, Fonseca C, et al. Using Autoantibodies and Cutaneous Subset to Develop Outcome-Based Disease Classification in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Mar 28;72(3):465–76.
 182. Yang HT, Hong XP, Guo JW, Zhong XL, Liao R, Liu CL, et al. Clinical Significance of Different Profiles of anti-Ro Antibodies in Connective Tissue Diseases. Batra L, editor. *J Immunol Res*. 2023 Jan 25;2023(Im):1–11.
 183. Lee AYS, Putty T, Lin MW, Swaminathan S, Suan D, Chataway T, et al. Isolated anti-Ro52 identifies a severe subset of Sjögren's syndrome patients. *Front Immunol*. 2023 Mar 16;14.
 184. Lee AYS, Lin MW, Reed JH. Anti-Ro52/TRIM21 serological subsets identify differential clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol*. 2022 Nov 23;41(11):3495–501.
 185. Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. Monospecific anti-Ro52/TRIM21 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects: evidence of an association with interstitial lung disease and worse survival. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4):131–5.
 186. Marie I, Hatron PY, Dominique S, Cherin P, Mouthon L, Menard JF, et al. Short-Term and Long-Term Outcome of Anti-Jo1-Positive Patients with Anti-Ro52 Antibody. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Jun;41(6):890–9.
 187. La Corte R, Lo Monaco A, Locaputo A, Dolzani F, Trotta F. In patients with antisynthetase syndrome the occurrence of anti-Ro/SSA antibodies causes a more severe interstitial lung disease. *Autoimmunity*. 2006 Jan 7;39(3):249–53.
 188. Correa-Rodríguez M, Pocovi-Gerardino G, Callejas-Rubio JL, Ríos-Fernández R, Martín-Amada M, Cruz-Caparrós MG, et al. Clinical and serological associations of autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Investig Med*. 2021 Dec;69(8):1417–25.
 189. Pan N, Amigues I, Lyman S, Duculan R, Aziz F, Crow MK, et al. A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months. *Lupus*. 2014;23(3):293–8.

190. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CGM. Measurement of increases in anti-double-stranded dna antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990 May;33(5):634–43.
191. Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2342–9.
192. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Cabrera-Villalba SR, et al. Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2018 Dec 13;20(1):275.
193. Macias-Muñoz L, Frade-Sosa B, Inciarte-Mundo J, Hidalgo S, Morla RM, Gallegos Y, et al. Analytical and clinical evaluation of DiaSorin Liaison® Calprotectin fecal assay adapted for serum samples. *J Clin Lab Anal.* 2022 Mar 5;36(3).
194. Inciarte-Mundo J, Frade-Sosa B, Sanmartí R. From bench to bedside: Calprotectin (S100A8/S100A9) as a biomarker in rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2022 Nov 3;13.
195. Fasano S, Milone A, Nicoletti GF, Isenberg DA, Ciccia F. Precision medicine in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2023;19(6):331–42.
196. Malik A, Sayed AA, Han P, Tan MMH, Watt E, Constantinescu-Bercu A, et al. The role of CD8+ T cell clones in immune thrombocytopenia. *Blood.* 2023 Feb 7;
197. Zou J, Li B, Li D, Bao H, She C, Ye J, et al. Comprehensive analysis of T-cell receptor repertoires reveals antigen-driven T-cell clusters in patients with Behçet's syndrome. *Eur J Immunol.* 2023 Apr 15;53(4).
198. Liu X, Zhang W, Zhao M, Fu L, Liu L, Wu J, et al. T cell receptor β repertoires as novel diagnostic markers for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2019 Aug;78(8):1070–8.
199. Schneider-Hohendorf T, Mohan H, Bien CG, Breuer J, Becker A, Görlich D, et al. CD8+ T-cell pathogenicity in Rasmussen encephalitis elucidated by large-scale T-cell receptor sequencing. *Nat Commun.* 2016 Apr 4;7(1):11153.
200. Ginsberg P, Panzer U, Asada N. Tissue-resident memory T cells in renal autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2023 Jan 23;14(January):15–7.
201. Pisetsky DS. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol.* 2023 Aug 10;19(8):509–24.
202. Sinha A, Kanungo S, Kim DR, Manna B, Song M, Park JY, et al.

- Antibody secreting B cells and plasma antibody response to rotavirus vaccination in infants from Kolkata India. *Heliyon*. 2018;4(1).
203. Fecher P, Caspell R, Naeem V, Karulin AY, Kuerten S, Lehmann P V. B cells and B cell Blasts Withstand Cryopreservation Producing Antibody. *Cells*. 2018;1–14.
 204. Winter O, Musiol S, Schablowsky M, Cheng Q, Khodadadi L, Hiepe F. Analyzing pathogenic (double-stranded (ds) DNA-specific) plasma cells via immunofluorescence microscopy. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):1.
 205. Jahnmatz P, Bengtsson T, Zuber B, Färnert A, Ahlborg N. An antigen-specific, four-color, B-cell FluoroSpot assay utilizing tagged antigens for detection. *J Immunol Methods*. 2016;433:23–30.
 206. Tian C, Chen Y, Liu Y, Wang S, Li Y, Wang G, et al. Use of ELISpot assay to study HBs-specific B cell responses in vaccinated and HBV infected humans article. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1).
 207. Hoving D, Marques AHC, Huisman W, Nosoh BA, de Kroon AC, van Hengel ORJ, et al. Combinatorial multimer staining and spectral flow cytometry facilitate quantification and characterization of polysaccharide-specific B cell immunity. *Commun Biol*. 2023 Oct 28;6(1):1095.
 208. Ruperto N, Hanrahan LM, Alarcón GS, Belmont HM, Brey RL, Brunetta P, et al. International consensus for a definition of disease flare in lupus. *Lupus*. 2011;20(5):453–62.
 209. Hanaoka H, Okazaki Y, Satoh T, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, et al. Circulating anti-double-stranded DNA antibody-secreting cells in patients with systemic lupus erythematosus: A novel biomarker for disease activity. *Lupus*. 2012;21(12):1284–93.
 210. Smith CD, Cyr M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am*. 1988 Apr;14(1):1–14.
 211. Tseng C, Buyon JP, Kim M, Belmont HM, Mackay M, Diamond B, et al. The effect of moderate-dose corticosteroids in preventing severe flares in patients with serologically active, but clinically stable, systemic lupus erythematosus: Findings of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov 30;54(11):3623–32.
 212. Kwon OC, Park MC. Risk of systemic lupus erythematosus flares according to autoantibody positivity at the time of diagnosis. *Sci Rep*. 2023 Feb 21;13(1):3068.
 213. Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H, et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med*. 2006;203(10):2255–61.
 214. Steiman AJ, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Prolonged serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus:

- p>frequency and outcome.
- J Rheumatol*
- . 2010 Sep;37(9):1822–7.
215. Walz LeBlanc BA, Gladman DD, Urowitz MB. Serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus--predictors of clinical flares. *J Rheumatol*. 1994 Dec;21(12):2239–41.
 216. Ohmura K. Which is the best SLE activity index for clinical trials? *Mod Rheumatol*. 2021;31(1):20–8.
 217. Mumtaz IM, Hoyer BF, Panne D, Moser K, Winter O, Cheng QY, et al. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: Implications for the treatment of autoimmunity. *J Autoimmun*. 2012;39(3):180–8.
 218. Dörner T, Jacobi AM, Lipsky PE. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):247.
 219. Tselios K, Gladman DD, Su J, Urowitz MB. Advanced chronic kidney disease in lupus nephritis: Is dialysis inevitable? *J Rheumatol*. 2020;47(9):1366–73.
 220. Riveros Frutos A, Holgado S, Sanvisens Bergé A, Casas I, Olivé A, López-Longo FJ, et al. Late-onset versus early-onset systemic lupus: characteristics and outcome in a national multicentre register (RELESSER). *Rheumatology*. 2021 Apr 6;60(4):1793–803.
 221. Di Maggio G, Confalonieri P, Salton F, Trotta L, Ruggero L, Kodric M, et al. Biomarkers in Systemic Sclerosis: An Overview. *Curr Issues Mol Biol*. 2023 Sep 25;45(10):7775–802.
 222. Perurena-Prieto J, Viñas-Giménez L, Sanz-Martínez MT, Selva-O'Callaghan A, Callejas-Moraga EL, Colobran R, et al. Anti-nuclear valosin-containing protein-like autoantibody is associated with calcinosis and higher risk of cancer in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2023 Sep 28;
 223. Khanna D, Lescoat A, Roofeh D, Bernstein EJ, Kazerooni EA, Roth MD, et al. Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease: How to Incorporate Two Food and Drug Administration–Approved Therapies in Clinical Practice. *Arthritis Rheumatol*. 2022 Jan 10;74(1):13–27.
 224. Cafaro G, Bartoloni E, Baldini C, Franceschini F, Riccieri V, Fioravanti A, et al. Autoantibody status according to multiparametric assay accurately estimates connective tissue disease classification and identifies clinically relevant disease clusters. *RMD Open*. 2023 Sep 21;9(3):e003365.
 225. Hoffmann-Vold AM, Maher TM, Philpot EE, Ashrafzadeh A, Barake R, Barsotti S, et al. The identification and management of interstitial lung disease in systemic sclerosis: evidence-based European consensus statements. *Lancet Rheumatol*. 2020 Feb;2(2):e71–83.
 226. Kuwana M, Gil-Vila A, Selva-O'Callaghan A. Role of autoantibodies in the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in autoimmune rheumatic disorders. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2021 Jan 27;13:1759720X2110324.

227. van Leeuwen NM, Wortel CM, Fehres CM, Bakker JA, Scherer HU, Toes REM, et al. Association Between Centromere- and Topoisomerase-specific Immune Responses and the Degree of Microangiopathy in Systemic Sclerosis. *J Rheumatol*. 2021 Mar;48(3):402–9.
228. Boonstra M, Bakker JA, Grummels A, Ninaber MK, Ajmone Marsan N, Wortel CM, et al. Association of Anti-Topoisomerase I Antibodies of the IgM Isotype With Disease Progression in Anti-Topoisomerase I-Positive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Nov 29;72(11):1897–904.
229. van Leeuwen NM, Boonstra M, Bakker JA, Grummels A, Jordan S, Liem S, et al. Anticentromere Antibody Levels and Isotypes and the Development of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2021 Dec 2;73(12):2338–47.
230. Hudson M, Pope J, Mahler M, Tatibouet S, Steele R, Baron M, et al. Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(2):R50.
231. Mahler M, Hudson M, Bentow C, Roup F, Beretta L, Pilar Simeón C, et al. Autoantibodies to stratify systemic sclerosis patients into clinically actionable subsets. *Autoimmun Rev*. 2020;19(8):102583.
232. Ferri C, De Angelis R, Giuggioli D, Bajocchi G, Dagna L, Zanframundo G, et al. Geographical heterogeneity of clinical and serological phenotypes of systemic sclerosis observed at tertiary referral centres. The experience of the Italian SIR-SPRING registry and review of the world literature. *Autoimmun Rev*. 2022 Oct;21(10):103159.
233. Curran AM, Naik P, Giles JT, Darrah E. PAD enzymes in rheumatoid arthritis: pathogenic effectors and autoimmune targets. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(6):301–15.
234. Lamacchia C, Courvoisier DS, Jarlborg M, Bas S, Roux-Lombard P, Möller B, et al. Predictive value of anti-CarP and anti-PAD3 antibodies alone or in combination with RF and ACPA for the severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2021;60(10):4598–608.
235. Martinez-Prat L, Lucia D, Ibarra C, Mahler M, Dervieux T. Antibodies targeting protein-arginine deiminase 4 (PAD4) demonstrate diagnostic value in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018;4:434–6.
236. Trouw LA, Mahler M. Closing the serological gap: Promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):318–22.
237. Ponikowska M, Świerkot J, Nowak B, Korman L, Wiland P. Autoantibody and metalloproteinase activity in early arthritis. *Clin Rheumatol*. 2019;38(3):827–34.
238. Alunno A, Bistoni O, Pratesi F, La Paglia GMC, Puxeddu I, Migliorini P, et al. Anti-citrullinated alpha enolase antibodies, interstitial lung disease and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2021;60(10):4598–608.

- Kingdom). 2018;57(5):850–5.
239. Alunno A, Bistoni O, Bonifacio AF, Gerli R. Autoantibodies and interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: towards a 'mix-and-match' approach? *Ann Rheum Dis*. 2020 Apr 2;0(0):annrheumdis-2020-217410.
 240. Alunno A, Bistoni O, Pratesi F, Topini F, Puxeddu I, Valentini V, et al. Association between anti-citrullinated alpha enolase antibodies and clinical features in a cohort of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Reumatismo*. 2018 Jul;70(2):67–71.
 241. Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Casafont-Solé I, et al. Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis*. 2020 May;79(5):587–94.
 242. Dai Y, Wang W, Yu Y, Hu S. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: an overview of epidemiology, pathogenesis and management. *Clin Rheumatol*. 2021;40(4):1211–20.
 243. Oka S, Higuchi T, Furukawa H, Shimada K, Okamoto A, Hashimoto A, et al. Serum rheumatoid factor IgA, anti-citrullinated peptide antibodies with secretory components, and anti-carbamylated protein antibodies associate with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022;23(1):1–8.
 244. Xie S, Li S, Chen B, Zhu Q, Xu L, Li F. Serum anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor increase the risk of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2021 Nov 1;40(11):4533–43.
 245. Correia CS, Briones MR, Guo R, Ostrowski RA. Elevated anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer is associated with increased risk for interstitial lung disease. *Clin Rheumatol*. 2019 Apr 15;38(4):1201–6.
 246. Restrepo JF, del Rincón I, Battafarano DF, Haas RW, Doria M, Escalante A. Clinical and laboratory factors associated with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2015 Sep 26;34(9):1529–36.
 247. Li L, Liu R, Zhang Y, Zhou J, Li Y, Xu Y, et al. A retrospective study on the predictive implications of clinical characteristics and therapeutic management in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Rheumatol*. 2020;39(5):1457–70.
 248. Zhang Y, Li H, Wu N, Dong X, Zheng Y. Retrospective study of the clinical characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Rheumatol*. 2017 Apr 1;36(4):817–23.
 249. Lee YH, Bae SC. Diagnostic accuracy of anti-Sa and anti-RA33 antibodies in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2017 Aug 16;76(6):535–8.

250. Yin Y, Liang D, Zhao L, Li Y, Liu W, Ren Y, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody is associated with interstitial lung disease in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2014 Apr 17;9(4).
251. Alevizos MK, Giles JT, Patel NM, Bernstein EJ. Risk of progression of interstitial pneumonia with autoimmune features to a systemic autoimmune rheumatic disease. *Rheumatology*. 2020 Jun 1;59(6):1233–40.
252. Kronzer VL, Huang W, Dellaripa PF, Huang S, Feathers V, Lu B, et al. Lifestyle and clinical risk factors for incident rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *J Rheumatol*. 2021 May 1;48(5):656–63.
253. Rinaldi S, Balsillie C, Truchon C, AL-Mubarak A, Mura M, Madill J. Nutrition implications of intrinsic restrictive lung disease. Vol. 37, *Nutrition in Clinical Practice*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 239–55.
254. Rinaldi S, Gilliland J, O'Connor C, Seabrook JA, Mura M, Madill J. Fat-Free Mass Index Controlled for Age and Sex and Malnutrition Are Predictors of Survival in Interstitial Lung Disease. *Respiration*. 2021 May 1;100(5):379–86.
255. Comes A, Wong AW, Fisher JH, Morisset J, Johannson KA, Farrand E, et al. Association of BMI and Change in Weight With Mortality in Patients With Fibrotic Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2022 May 1;161(5):1320–9.
256. Matteson EL, Matucci-Cerinic M, Kreuter M, Burmester GR, Dieudé P, Emery P, et al. Patient-level factors predictive of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a systematic review. *RMD open*. 2023;9(3):1–12.
257. Sparks JA, He X, Huang J, Fletcher EA, Zaccardelli A, Friedlander HM, et al. Rheumatoid arthritis disease activity predicting incident clinically-apparent RA-associated interstitial lung disease: A prospective cohort study. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Apr 5;art.40904.
258. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Jt Bone Spine*. 2013 Jan;80(1):29–33.
259. Fu Q, Wang L, Li L, Li Y, Liu R, Zheng Y. Risk factors for progression and prognosis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: single center study with a large sample of Chinese population. *Clin Rheumatol*. 2019 Apr 2;38(4):1109–16.
260. Singh N, Varghese J, England BR, Solomon JJ, Michaud K, Mikuls TR, et al. Impact of the pattern of interstitial lung disease on mortality in rheumatoid arthritis: A systematic literature review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2019 Dec 1;49(3):358–65.
261. Tzovara I, Papadatou I, Tzanoudaki M, Spoulou V. Development of a novel flow cytometry method for detecting pneumococcal-specific B

- cells. Cytom Part A. 2022 May 24;
262. Newell KL, Waldran MJ, Thomas SJ, Endy TP, Waickman AT. Simultaneous analysis of antigen-specific B and T cells after SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cytom Part A*. 2022;101(6):474–82.
 263. Hernandez-Davies JE, Dollinger EP, Pone EJ, Felgner J, Liang L, Strohmeier S, et al. Magnitude and breadth of antibody cross-reactivity induced by recombinant influenza hemagglutinin trimer vaccine is enhanced by combination adjuvants. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–20.
 264. García-Moreno C, Gómara MJ, Castellanos-Moreira R, Sanmartí R, Haro I. Peptides Bearing Multiple Post-Translational Modifications as Antigenic Targets for Severe Rheumatoid Arthritis Patients. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 10;22(24):13290.
 265. de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol*. 2019 Dec 17;59(1):2.
 266. Fierz W, Bossuyt X. Likelihood Ratios as Value Proposition for Diagnostic Laboratory Tests. *J Appl Lab Med*. 2020 Sep 1;5(5):1061–9.
 267. Bossuyt X, De Langhe E, Borghi MO, Meroni PL. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(12):715–26.
 268. Van Hoovels L, Jacobs J, Vander Cruyssen B, Van den Breemt S, Verschueren P, Bossuyt X. Performance characteristics of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody assays may impact ACR/EULAR classification of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018 May;77(5):667–77.
 269. Motta F, Bizzaro N, Giavarina D, Franceschini F, Infantino M, Palterer B, et al. Rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis diagnosis and prognosis: a systematic review and meta-analysis. *RMD Open*. 2023 Aug 4;9(3):e002817.
 270. Busch MH, Aendekerk JP, van Beers JJBC, van Paassen P, Damoiseaux JGMC. Evaluation of the diagnostic performance of an immunoblot for ANCA and anti-GBM antibody detection. *Autoimmunity*. 2021 Jan 2;54(1):45–50.
 271. Mehta P, Balakrishnan A, Phatak S, Pathak M, Ahmed S. Diagnostic accuracy of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in predicting relapses of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2022 Aug 30;43(3):437–48.
 272. Ogrič M, Švec T, Poljšak KM, Žigon P, Hočevár A, Čučnik S. Verification, implementation and harmonization of automated chemiluminescent immunoassays for MPO- and PR3-ANCA detection. *Clin Chem Lab Med*. 2024 Mar 25;62(4):682–9.

IX. Annex: Articles publicats

Publicació 1

Anti-dsDNA B-cell ELISpot as a Monitoring and Flare Prediction Tool in SLE Patients

Albert Pérez-Isidro, Marc Xipel, Arturo Llobell, Noemí De Moner, Gema M. Lledó, Ricard Cervera, Sergio Prieto-González, Luis F. Quintana, Gerard Espinosa, Mila García-Ormaechea, Estíbaliz Ruiz-Ortiz, Odette Viñas

Journal of Clinical Medicine 2023; 12, 1295

(doi: [10.3390/jcm12041295](https://doi.org/10.3390/jcm12041295))

Impact Factor (2022): 3.9

2on tercil (58/167) de la categoria *Medicine, General & Internal* (JCR)

H Index (2022): 95; SJR (2022): 0.935

1er tercil (521/2371) de la categoria *Medicine* (SJR)

Article

Anti-dsDNA B-Cell ELISpot as a Monitoring and Flare Prediction Tool in SLE Patients

Albert Pérez-Isidro ^{1,2} , Marc Xipell ^{2,3,4}, Arturo Llobell ^{1,2}, Noemí De Moner ¹, Gema M. Lledó ^{2,5,6} , Ricard Cervera ^{2,5,6} , Sergio Prieto-González ^{2,5,6} , Luis F. Quintana ^{2,3,4} , Gerard Espinosa ^{2,5,6} , Mila García-Ormaechea ^{1,7}, Estibaliz Ruiz-Ortiz ^{1,2,*} and Odette Viñas ^{1,2,*}

- ¹ Department of Immunology, Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB), Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain
- ² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain
- ³ Department of Nephrology and Renal Transplantation, Hospital Clínic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁴ Reference Centre for Complex Glomerular Disease (CSUR) of the Spanish Health System, 08036 Barcelona, Spain
- ⁵ Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁶ Reference Centre for Systemic Autoimmune Diseases (CSUR) of the Spanish Health System, 08036 Barcelona, Spain
- ⁷ Lime Tree Surgery NHS, Worthing BN14 0DL, UK
- * Correspondence: esruiz@clinic.cat (E.R.-O.); ovinyas@clinic.cat (O.V.)

Abstract: Anti-dsDNA autoantibodies quantification and complement levels are widely used to monitor disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE). However, better biomarkers are still needed. We hypothesised whether the dsDNA antibody-secreting B-cells could be a complementary biomarker in disease activity and prognosis of SLE patients. Fifty-two SLE patients were enrolled and followed for up to 12 months. Additionally, 39 controls were included. An activity cut-off (comparing active and non-active patients according to clinical SLEDAI-2K) was established for SLE-ELISpot, chemiluminescence and *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence tests (≥ 11.24 , ≥ 374.1 and ≥ 1 , respectively). Assays performances together with complement status were compared regarding major organ involvement at the inclusion and flare-up risk prediction after follow-up. SLE-ELISpot showed the best performance in identifying active patients. High SLE-ELISpot results were associated with haematological involvement and, after follow-up, with an increased hazard ratio for disease flare-up (3.4) and especially renal flare (6.5). Additionally, the combination of hypocomplementemia and high SLE-ELISpot results increased those risks up to 5.2 and 32.9, respectively. SLE-ELISpot offers complementary information to anti-dsDNA autoantibodies to evaluate the risk of a flare-up in the following year. In some cases, adding SLE-ELISpot to the current follow-up protocol for SLE patients can improve clinicians' personalised care decisions.

Keywords: systemic lupus erythematosus; SLE biomarkers; SLE nephritis; SLE disease activity; antibody secreting cells ELISpot; anti-dsDNA autoantibodies



Citation: Pérez-Isidro, A.; Xipell, M.; Llobell, A.; De Moner, N.; Lledó, G.M.; Cervera, R.; Prieto-González, S.; Quintana, L.F.; Espinosa, G.; García-Ormaechea, M.; et al. Anti-dsDNA B-Cell ELISpot as a Monitoring and Flare Prediction Tool in SLE Patients. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 1295. <https://doi.org/10.3390/jcm12041295>

Academic Editor: Emmanuel André

Received: 3 January 2023

Revised: 2 February 2023

Accepted: 3 February 2023

Published: 6 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterised by recurrent flares affecting several organs. Dysregulation of innate and adaptive immune responses leads to increased production of inflammatory cytokines, autoantibodies as well as immune complex deposition, which finally may cause severe organ damage [1]. The diagnosis of SLE, based on several clinical and laboratory parameters, is difficult due to the high heterogeneity of SLE manifestations among patients [2]. It was expected that autoantibodies detectable in SLE patients might be responsible for the wide range of disease manifestations and could be used to predict disease subsets and prognosis [3]. However, only IgG anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) together with IgG anti-Sm

autoantibodies are included in SLE classification criteria since 1982 as highly specific autoantibodies [2,4–6]. Furthermore, complement levels and anti-dsDNA autoantibodies titres, both included in the SLE disease activity index (SLEDAI-2K) score [7], have been associated with clinical activity in SLE patients [8]. Nevertheless, anti-dsDNA autoantibodies titres are not enough to reflect the clinical activity of the disease in all patients [8]. Additionally, dsDNA autoantibodies can be directed to a wide range of different DNA-like structures with different specificities and avidities [9]. This fact could limit the autoantibody detection capacity of some assays which are using a specific dsDNA source.

The anti-dsDNA autoantibodies are produced by long-lived plasma cells in the bone marrow but, as demonstrated in lupus-prone mice and also in humans, short-lived antibody-secreting cells (ASC) also generate anti-dsDNA autoantibodies [10,11]. Thereafter, both short-lived ASCs and long-lived plasma cells participate in the production of anti-dsDNA autoantibodies in SLE [10,12,13]. The cytokine imbalance in SLE patients could affect both short-lived and long-lived ASC differentiation and survival [14–16]. Furthermore, it is known that short-lived ASCs are sensitive to most immunosuppressive treatments, including those directed to CD20 such as rituximab, but long-lived plasma cells are not. The latter are directly responsible for the persistent antibody levels in treated patients contributing to chronicity and disease relapses [12,17,18].

Better activity and organ involvement biomarkers are still needed to predict SLE flares or to evaluate B-cell targeting treatments [8]. Published data suggests that quantification of anti-dsDNA peripheral blood ASCs may be a promising biomarker for disease activity, major organ involvement and flare risk in SLE patients [19].

The B-cell ELISpot was first described in 1983 [20]. Since then, several studies have shown that the ELISpot assay can be used to detect B cell antigen-specific responses to different autoantigens like platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa (gpIIb-IIIa) [21], dsDNA [17,22], glutamic acid decarboxylase [23] and insulinoma antigen 2 [23]. Kuwana et al. described a good correlation between the ELISpot quantification of ASC against anti-gpIIb-IIIa from the spleen and peripheral blood, supporting the use of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for the B-cell ELISpot assay [21]. Although the ELISpot T-cell assay based on the detection of IFN- γ production upon antigen recognition of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens [24] and SARS-CoV-2 antigens [25] is widely used, the use of antigen specific B-cell ELISpot currently remains limited to research and is still a manual, tricky and time-consuming assay.

The aim of the present study is to assess whether the anti-dsDNA ASC ELISpot (SLE-ELISpot) assay could provide better characterization of SLE patients in relation to disease activity or occurrence of flare ups compared with the usual commercially available anti-dsDNA autoantibodies assays used in autoimmunity laboratories for SLE management.

2. Patients and Methods

2.1. Patients Selection and Data Collection

We recruited a cohort of 91 individuals from our centre (Hospital Clínic de Barcelona) between January 2018 and February 2019 including 52 consecutive SLE patients, 21 patients diagnosed with other AID but without SLE (disease controls) and 18 healthy controls. The inclusion criteria were to fulfil the 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for SLE [2] and patients being or who had been under B-cell treatment in the previous year were not included. Of the 52 SLE patients, 21 (40.4%) of them had an additional autoimmune disease (AID) being those Sjögren syndrome (n = 7), Sjögren syndrome and anti-phospholipid syndrome (n = 4), anti-phospholipid syndrome (n = 4), dermatomyositis (n = 2), Sjögren syndrome and dermatomyositis (n = 1), rheumatoid arthritis (n = 1), hypocomplementemic urticarial vasculitis (n = 1), and systemic sclerosis with dermatomyositis (n = 1). As controls, besides the 18 healthy individuals, we included 21 disease controls patients diagnosed with other AID but without SLE, such as rheumatoid arthritis (n = 9), Sjögren syndrome (n = 3),

systemic vasculitis (n = 3), systemic sclerosis (n = 3), sarcoidosis (n = 1), anti-phospholipid syndrome (n = 1) and Crohn's disease (n = 1).

Clinical features, demographic characteristics and laboratory parameters were collected from all patients. All SLE patients were followed by the same physicians (RC, GE, GMLL, SPG) at regular outpatient visits during the study period. Appointments occurred at least every 6 to 12 months or more frequently, depending on the clinical severity of each patient's disease. At each appointment, symptoms and signs of SLE activity were checked together with laboratory abnormalities including blood cell count, renal and hepatic functions, urine profile with proteinuria and protein/creatinine ratio, levels of C3, C4 and CH50 and anti-dsDNA autoantibodies (these laboratory results are not analysed in this study). Specifically, those patients with active lupus nephritis were followed at the multidisciplinary unit by GE, MX and LQ. In this case, visits occurred every month during the first 3 to 6 months.

Active SLE disease was established by a clinical SLEDAI-2K > 4 at the moment of inclusion [7]. SLE flare was defined, based on an international consensus [26], as a measurable increase in disease activity (clinical SLEDAI-2K > 4 at the flare moment) involving new or worsening clinical signs and symptoms and/or laboratory measurements evaluated by the attending physician, leading to the consideration to change or increase treatment. Clinical SLEDAI-2K is an adaptation of SLEDAI-2K excluding the points coming from anti-dsDNA and complement status. Renal involvement was confirmed by biopsy-proven lupus nephritis according to the 2003 International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) classification [27,28]. In addition, renal activity and chronic damage were determined using the National Institute of Health (NIH) activity and chronicity indexes, respectively [29].

2.2. Blood Samples

For the SLE-ELISpot, heparinised blood samples of SLE patients and controls were obtained at the time of inclusion. Within 6 h after blood extraction, PBMCs were isolated by Ficoll density gradient (Ficoll-Lymphoprep). Subsequently, PBMCs were frozen in 200 µL media and 200 µL DMSO solution (media: RPMI with 10% FBS and 10% Penicillin/Streptavidin; DMSO solution: PBS with 20% DMSO) and stored at −80 °C, until SLE-ELISpot was performed.

For anti-dsDNA autoantibodies determination, serum samples were obtained and stored in 1.5 mL Eppendorf tubes at −20 °C. Complement tests were performed with fresh sera obtained simultaneously with blood samples.

2.3. Anti-dsDNA Autoantibodies Detection and Complement Tests

IgG anti-dsDNA autoantibodies were quantified in serum samples by the commercial chemiluminescence immunoassay (CIA) (QUANTA Flash®; Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA) in the BIO-FLASH® instrument (Biokit, Barcelona, Spain). The manufacturer's recommended cut-off was used (20 IU/mL). Moreover, IgG anti-dsDNA autoantibodies were analysed by *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test (CLIFT) (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA), with sera diluted 1:10. Results were reported as negative or positive (positive results were arbitrary ranged from 1 to 8 according to fluorescence intensity at fluorescence microscopy in comparison with a positive control (1:160) by trained personnel). The reference value is negative.

Complement (C3, C4) serum levels and activity (CH50) were measured by turbidimetric immunoassay (Atellica CH C3 and Atellica CH C4; Siemens, New York, NY, USA and Autokit CH50; Fujifilm Wako Chemicals, Neuss, Germany, all are tested in Atellica CH Solution, Siemens, New York, NY, USA). Reference values were: 0.870–1.700 g/L for C3, 0.110–0.540 g/L for C4 and 28–60 U/mL for CH50. Hypocomplementemia was considered when either CH50 activity or C3 or C4 levels were lower than reference values.

2.4. SLE-ELISpot Assay Conditions Standardization

From Hanaoka's stated conditions, some other conditions were tested, and we selected the best ones (Supplementary Table S1). As a major change, the dsDNA was not treated with nuclease because no significant differences were observed with and without treatment. Additionally, the dsDNA coating strategy was changed from albumin coating to DNA Coating Solution® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Afterwards, all samples collected at the time of inclusion were tested with the same conditions.

2.5. SLE-ELISpot Assay

Following the ELISpot design from Hanaoka [19] and the previous conditions tested, the PVDF plate (Millipore, Bedford, MA, USA) was sensitised with 100 µL calf thymus DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted with DNA Coating Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (100 µg/mL) following the distribution of the wells shown in Figure 1. After overnight incubation at 4 °C, the plate was washed with washing solution (PBS with 0.5 mM CaCl₂ and 0.05% Tween 20) and blocked with the blocking solution (PBS with 5% FBS and 3% BSA) for 1 h 30 min. Patients' PBMCs were thawed with RPMI media at 37 °C and viability was checked in a Neubauer chamber with Trypan Blue solution. Patients' PBMCs (50 µL/well at 10×10^6 PBMCs/mL), as well as undiluted sera samples (from patients and controls), were incubated for 4 h at 37 °C. Afterwards, plates were washed with washing solution and incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (80 µL/well, diluted 1:1000 in PBS-Ca) for 2 h. Following incubation with Nitro Blue Tetrazolium solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (100 µL/well) for 7–10 min, anti-dsDNA IgG immune-complexes identified by the anti-human IgG were visualised as spots. After stopping the reaction using tap water, the plate was dried in a dry oven for at least 1 h at 37 °C and stored thereafter at 4 °C. Spots were counted by an automatic ELISpot Reader (AID ELISpot ELRIFL04) using the ELISpot Reader version 7.0 (AID GmbH, Penzberg, Germany) software.

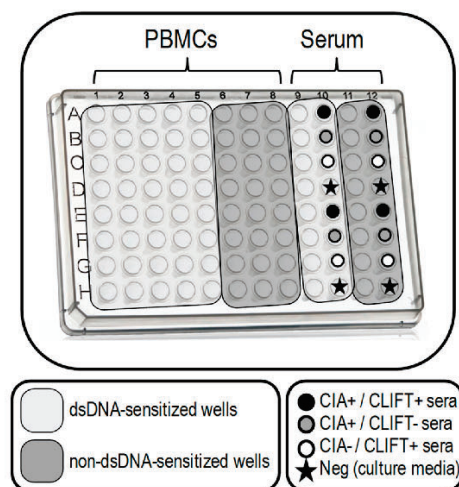


Figure 1. SLE-ELISpot plate design. SLE-ELISpot assay was performed with PBMCs (columns 1 to 8). Sera samples (columns 9 to 12) were included as a control for the technical procedure (being columns 9 and 11 for patients sera and columns 8 and 10 for selected controls with a known result for CIA and CLIFT). Wells in light grey are dsDNA-sensitized. Dark grey wells are non-dsDNA-sensitized. Each row was used for one patient.

In order to assure proper dsDNA plate sensitisation and correct specificity, we introduced the following modifications: (1) we tested PBMCs and sera controls in non-dsDNA-sensitised wells in addition to dsDNA-sensitised wells and (2) we included one negative control (culture media) and three positive: one positive serum for anti-dsDNA autoantibodies by CIA and CLIFT and two single positive sera either by CIA or CLIFT.

2.6. Statistics

The IBM SPSS Statistics PC package (Version 22) was used for statistical analyses. Results for p values < 0.05 were considered statistically significant. Cut-off values were established through the receiver operating characteristics (ROC) curve analysis and the highest Youden Index value was chosen. The continuous data were described by the mean and standard deviation (SD) or median and 25th/75th interquartile range (IQR), according to its distribution. Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages. Normality was assessed by the Shapiro–Wilk test or Kolmogorov–Smirnov test depending on the sample size. Differences in proportions were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test when the expected counts were ≤ 5 . Differences in means of continuous variables were analysed using the parametric Student t -test or the Mann–Whitney nonparametric U test when the variable distribution was not normal. Correlations were calculated with Pearson's R , Spearman's coefficient or Kendall's tau b depending on the type of variable. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95%CI) were also calculated. We analysed the presence of a SLE flare for 12 months follow-up by the Kaplan–Meier curves for each condition and potential significant differences were evaluated by the log-rank test. Finally, hazard ratio (HR) and 95%CI were calculated.

3. Results

3.1. Study Cohort

The study cohort consisted of 91 individuals. There were no significant differences in age or sex between SLE patients (SLE [$n = 31$] and overlap SLE-AID [$n = 21$]) and controls (healthy [$n = 18$] and AID individuals [$n = 21$]). Clinical features, including demographic characteristics, disease activity measured by clinical SLEDAI-2K, major organ involvement (including renal, articular, haematological, cutaneous involvement and serositis) and disease flares as well as laboratory parameters are shown in Table 1. No differences were found either in clinical SLEDAI-2K, active disease, major organ involvement, anti-dsDNA autoantibodies (measured by CIA and CLIFT) or hypocomplementemia between SLE and overlap SLE-AID groups. Therefore, all patients with SLE, alone or overlapping with another AID, have been analysed together in a single group.

3.2. SLE-ELISpot Improved Assay

Based on the modifications made to the ELISpot described by Hanaoka et al. [19], the design of our SLE-ELISpot assay is shown in Figure 1. Results, ranging from 0 to ∞ , were calculated according to the following formula attending to PBMCs wells:

$$\text{SLE-ELISpot result} = \bar{x}_{\text{sens}} - \bar{x}_{\text{non-sens}}$$

$\bar{x}_{\text{sens}}$: average number of spots in dsDNA-sensitised wells

$\bar{x}_{\text{non-sens}}$: average number of spots in non-dsDNA-sensitised wells

Wells with sera samples were also included in the plate as controls of the technical procedure.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study cohort.

	Control Group		SLE Group		Intra-SLE Group (p Value)
	Healthy Controls (n = 18)	AID Controls (n = 21)	SLE (n = 31)	SLE Overlapping Other AID (n = 21)	
Sex: female, n (%)	16 (88.9%)	17 (81.0%)	29 (93.5%)	19 (90.5%)	0.999
Age, mean $\pm$ SD	32 $\pm$ 10	53 $\pm$ 13	41 $\pm$ 15	46 $\pm$ 16	0.183
Anti-dsDNA autoantibodies (CIA), mean $\pm$ SD	12.4 $\pm$ 5.6	49.6 $\pm$ 68.9	209.0 $\pm$ 223.4	163.8 $\pm$ 192.8	0.441
Anti-dsDNA autoantibodies (CLIFT), n (%)	0 (0.0%)	4 (19.0%)	21 (67.7%)	13 (61.9%)	0.769
Hyponatremia, n (%)	-	-	17 (54.8%)	13 (61.9%)	0.776
clinical SLEDAI-2K, median [IQR]	-	-	4 [2–13]	4 [4–8]	0.784
Active disease (clinical SLEDAI-2K $\geq$ 4), n (%)	-	-	13 (41.9%)	8 (38.1%)	0.999
Major organ involvement (at sampling)					
Renal involvement, n (%)	-	-	19 (61.3%)	9 (42.9%)	0.259
Active, n (%)	-	-	10 (45.5%)	6 (33.3%)	0.526
Chronic, n (%)	-	-	16 (57.1%)	8 (40.0%)	0.380
Articular involvement, n (%)	-	-	4 (12.9%)	4 (19.0%)	0.700
Haematological involvement, n (%)	-	-	5 (16.1%)	3 (14.3%)	0.999
Cutaneous involvement, n (%)	-	-	4 (12.9%)	3 (14.3%)	0.999
Presence of serositis, n (%)	-	-	5 (16.1%)	2 (9.5%)	0.687
Patients with a flare at follow-up, n (%)	-	-	8 (25.8%)	6 (28.6%)	0.999
Patients with renal flare, n (%)	-	-	4 (12.9%)	3 (14.3%)	0.999
Days between sample and flare, mean $\pm$ SD	-	-	238 $\pm$ 99	150 $\pm$ 88	0.285

Abbreviations: AID: autoimmune diseases; SLE: systemic lupus erythematosus; clinical SLEDAI: SLE disease activity index.

3.3. Clinical Performance of SLE-ELISpot, CIA and CLIFT

Two different reference values were established for all three assays through the ROC curves analysis choosing the highest Youden Index value: (1) a “diagnostic cut-off” comparing SLE patients with healthy controls and (2) an “activity cut-off” comparing active and non-active SLE patients.

In our cohort, the diagnostic cut-off for CIA and CLIFT coincided with the manufacturer recommended cut-off (≥ 20 IU/mL for CIA and ≥ 1 (negative or positive) for CLIFT). The sensitivity and specificity were 87.0% and 88.9% for CIA and 64.8% and 100% for CLIFT. We established the SLE-ELISpot diagnostic cut-off in ≥ 1.8 spots with 64.8% sensitivity and 77.8% specificity.

As expected, CIA and CLIFT showed much better sensitivity and specificity for SLE diagnosis than SLE-ELISpot (Figure 2A). Therefore, SLE-ELISpot was not able to improve the current diagnostic tools.

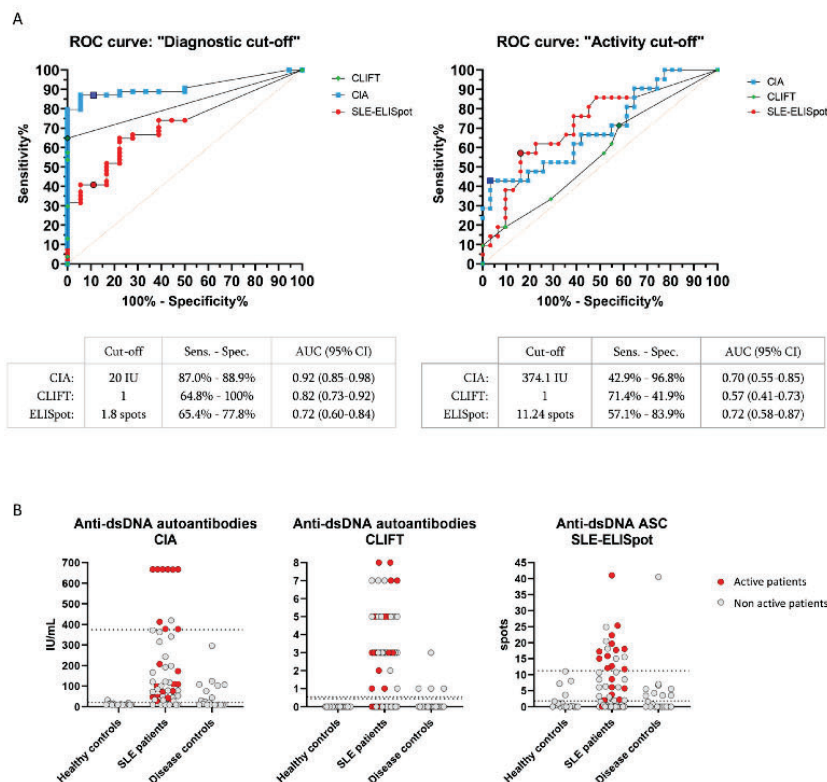


Figure 2. CIA, CLIFT and SLE-ELISpot results: ROC curves and values distribution. ROC curves analysis using diagnostic cut-off (A, left) and activity cut-off (A, right) for CIA, CLIFT and SLE-ELISpot. Bordered signs indicate selected cut-off points. Values distribution for CIA (B, left), CLIFT (B, middle) and SLE-ELISpot (B, right). Dashed lines: diagnostic cut-off. Pointed lines: activity cut-off. Red signs indicate active SLE patients. Grey signs indicate non-active SLE patients. Abbreviations: AUC (Area under the curve); Sens (Sensitivity); Spec (Specificity).

Regarding the activity cut-off, established through the comparison of active and non-active patients, SLE-ELISpot activity cut-off (>11.24 spots) had a sensitivity and specificity of 57.1% and 83.9%, respectively. Conversely, CIA (≥ 374.1 IU/mL) and CLIFT (≥ 1) activity cut-offs showed 42.9% and 71.4% sensitivity and 96.8% and 41.9% specificity, respectively (Figure 2A). Values for CIA, CLIFT and SLE-ELISpot of active and non-active patients, are shown in Figure 2B.

Thus, SLE-ELISpot activity cut-off showed a better Youden Index than CIA and CLIFT to identify active SLE patients (0.410 vs. 0.397 and 0.133, respectively).

Consequently, for the rest of this paper, we focused on the activity cut-off. A result above the activity cut-off will be referred to as "high" and a result under the activity cut-off will be referred to as "low".

3.4. Association with Major Organ Involvement in SLE Patients

At the time of inclusion in the study, lupus nephritis ($n = 28$) was the most common organ involvement followed by joint ($n = 8$), haematological ($n = 8$) and skin involvement ($n = 7$), and the presence of serositis ($n = 7$) (Table 1). Hypocomplementemia was associated with lupus nephritis (OR 7.3 [95%CI 2.1–25.3]). A high CIA result was associated with articular (OR 6.3 [95%CI 1.2–32.4]) and haematological involvement (OR 6.3 [95%CI 1.2–32.4]). A high SLE-ELISpot result was associated with haematological involvement (OR 23.8 [95%CI 2.6–217.1]). Additionally, SLE-ELISpot but not CIA results were higher in patients with haematological involvement than in patients without (median 16.73 (13.5–20.2) and 2.60 (0.0–10.7); $p < 0.001$, respectively). Finally, a high SLE-ELISpot result combined with hypocomplementemia was associated with articular involvement with an OR = 6.3 (95%CI 1.4–26.9) (Figure 3). No other combination was associated with major organ involvement.

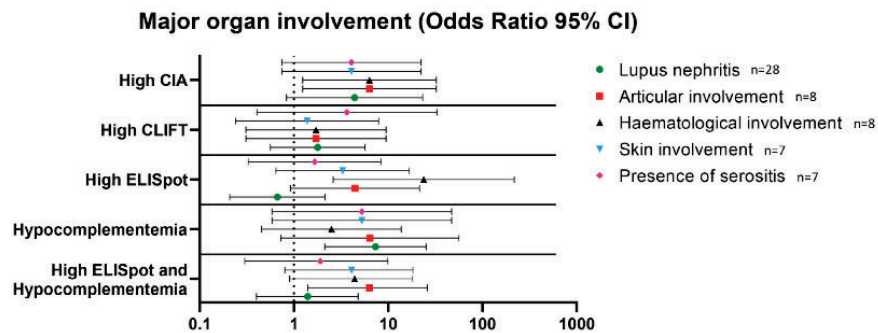


Figure 3. Association between high levels of anti-dsDNA antibodies measured by CIA, CLIFT and ELISpot and hypocomplementemia and major organ involvement. Results are expressed as odds ratios and 95% confidence intervals. Abbreviations: CIA: chemiluminescence immunoassay; CLIFT: *Critithidia luciliae* indirect immunofluorescence test.

3.5. Flare Prediction Capacity

Regarding the 52 SLE patients, 14 (26.9%) presented with a flare up during the 12-month follow-up. Eight (57.1%) of these patients had a high SLE-ELISpot result while six (42.9%) had a low SLE-ELISpot result. Moreover, 29 out of 35 (82.9%) low SLE-ELISpot patients did not have a flare up while eight out of 17 (47.1%) high SLE-ELISpot patients presented with a flare up in the following year. Thus, patients with a high SLE-ELISpot result had a significantly increased hazard ratio (HR) to present with a flare up (HR: 3.4 [95%CI 1.1–10.5]) (Figure 4). The combination of hypocomplementemia and a high SLE-ELISpot was related to a high risk of a flare up (HR: 5.2 [95%CI 1.3–20.4]) (Figure 4). Neither high CIA, CLIFT or hypocomplementemia alone were significantly associated with an SLE flare up in a 1-year follow-up (Figure 4).

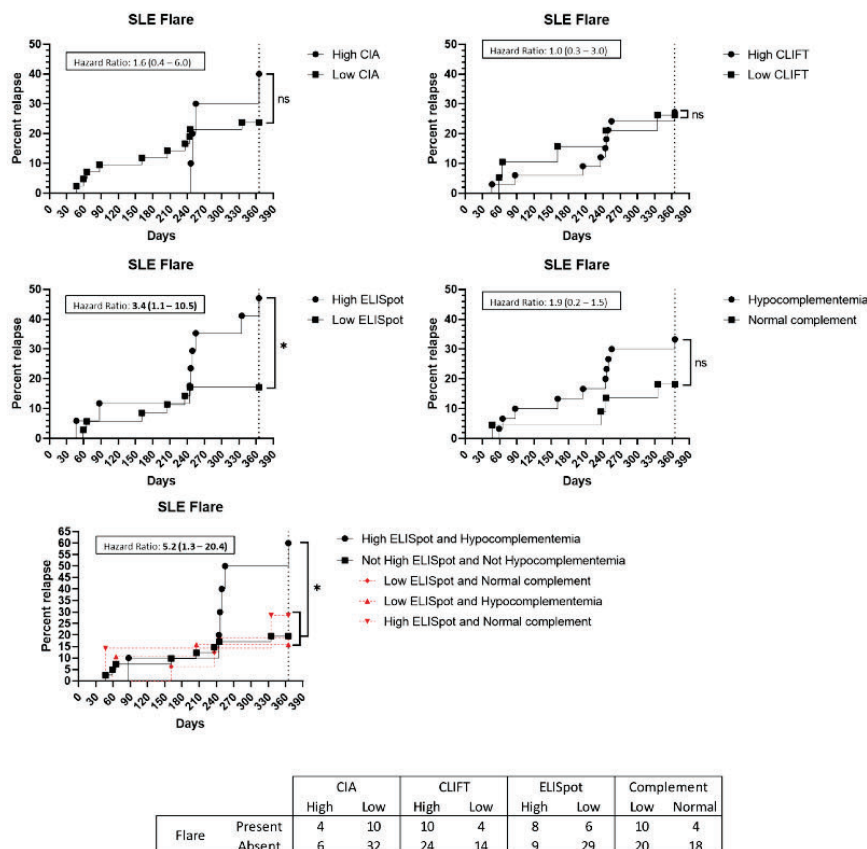


Figure 4. Flare up prediction capacity: Kaplan–Meier survival analysis and hazard ratio. X-axis: days from sampling to flare up. Y-axis: percentage of patients presenting with a flare up. ns: non-significant. *: $p < 0.05$. Abbreviations: CIA: chemiluminescence immunoassay; CLIFT: *Critidia luciliae* indirect immunofluorescence test; SLE: systemic lupus erythematosus.

Among the 14 SLE patients with a flare up, seven (50%) presented biopsy-proven kidney involvement. Two of them had a low SLE-ELISpot while five had a high result. Hypocomplementemia at baseline was present in all seven patients with lupus nephritis at the time of the flare up. A high SLE-ELISpot result implies an increased HR for patients to have a kidney involved flare up (IRR: 6.5 (95%CI 1.3–32.2)) (Figure 5). Additionally, the combination of hypocomplementemia and a high SLE-ELISpot raises the HR to 32.9 (95%CI 4.9–221.3) (Figure 5). Conversely, high CIA or CLIFT values were not significantly associated with an increased risk of a renal flare up at the 1-year follow-up (Figure 5).

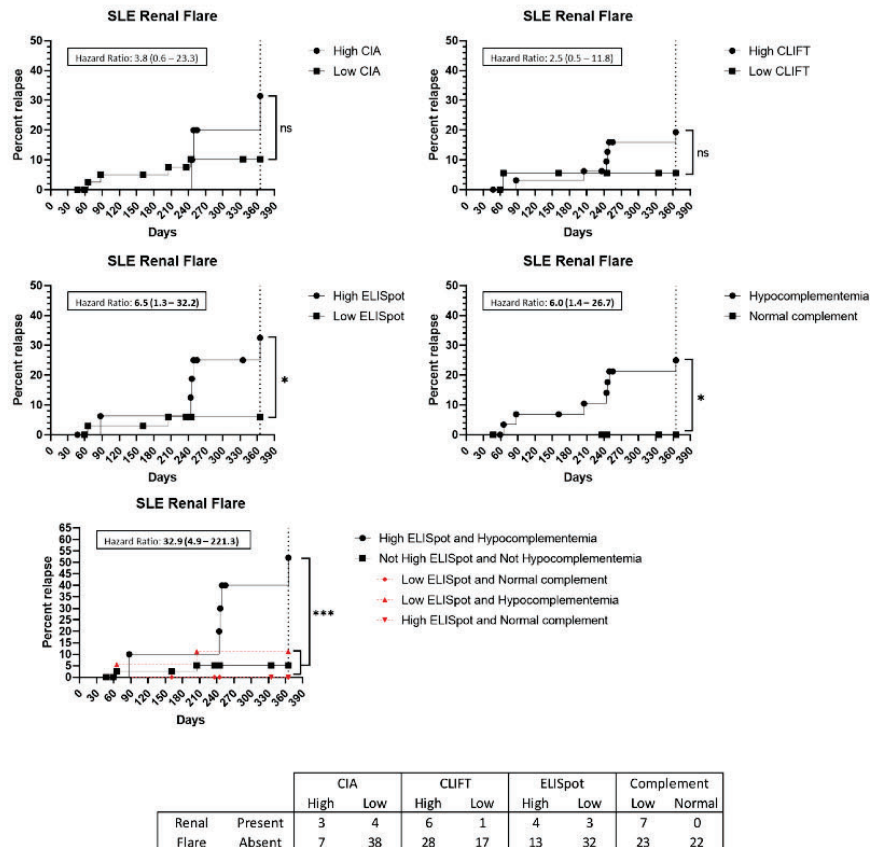


Figure 5. Renal flare up prediction capacity: Kaplan–Meier survival analysis and hazard ratio. X-axis: days from sampling to flare up. Y-axis: percentage of patients presenting with a flare up. ns: non-significant. *: $p < 0.05$. ***: $p < 0.001$. Abbreviations: CIA: chemiluminescence immunoassay; CLIFT: *Critidia luciliae* indirect immunofluorescence test; SLE: systemic lupus erythematosus.

Furthermore, nine patients presented with a flare up involving joints. However, none of the tested methods, alone or in combination, were predictive of an articular flare up (Figure 6). Cutaneous ($n = 2$) and haematological ($n = 2$) flare ups were not analysed due to low incidence.

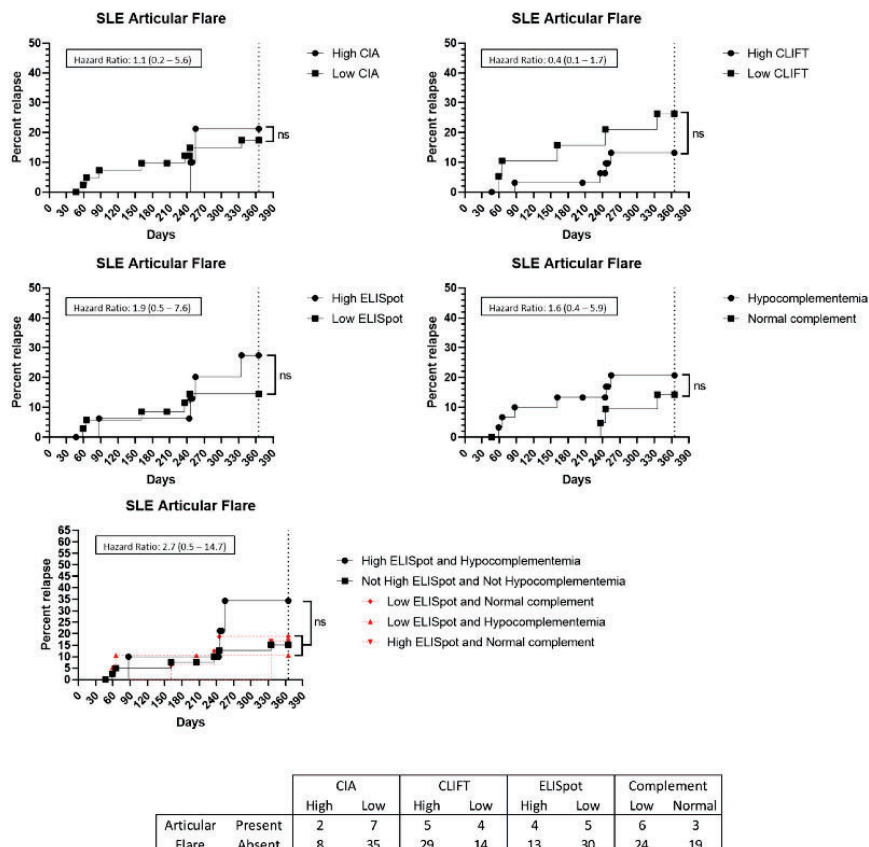


Figure 6. Articular flare up prediction capacity: Kaplan–Meier survival analysis and hazard ratio. X-axis: days from sampling to flare up. Y-axis: percentage of patients presenting with a flare up. ns: non-significant. Abbreviations: CIA: chemiluminescence immunoassay; CLIFT: *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test; SLE: systemic lupus erythematosus.

4. Discussion

This study aimed to analyse whether the quantification of anti-dsDNA autoantibodies secreting cells (ASC), detected by SLE-ELISpot in blood samples of patients with SLE, could provide any advantage for disease activity or prognostic evaluation, short-term flare up prediction or major organ involvement.

It is known that anti-dsDNA autoantibodies are produced by short-lived ASCs localised in peripheral blood, in addition to long-lived plasma cells, mainly absent in peripheral blood [10]. A good correlation between peripheral blood and spleen antigen-specific ASCs quantification has been shown [21]. Thus, the quantification of ASCs in peripheral blood could add relevant clinical information regarding disease activity or flare up prediction.

In the first part of the study, we introduced some modifications to the ELISpot assay designed by Hanaoka [19]. Firstly, to achieve a greater specificity of the assay, non-dsDNA-sensitised wells were included in the SLE-ELISpot design allowing the SLE-ELISpot result

to be calculated as the subtraction of the non-dsDNA-sensitised wells' number of spots from the spots obtained on the dsDNA-sensitised wells. Moreover, two different cut-off values were established to assess the clinical value of the quantification of specific anti-dsDNA ASC from peripheral blood: one directed to diagnosis accuracy, named "diagnosis cut-off", and a second one to better identify disease activity named "activity cut-off". As expected, using the diagnostic cut-off (≥ 1.8 spots), SLE-ELISpot was far less sensitive for diagnosis than IgG anti-dsDNA autoantibodies determination by CIA and CLIFT. However, in the present study SLE-ELISpot was the best method to identify active patients. Although it needs to be confirmed in larger cohorts, these results suggest that the SLE-ELISpot assay may help to better stratify active and non-active patients.

In the second part of the study, we studied the association between SLE-ELISpot, CIA and CLIFT results with clinical manifestations at inclusion time and the flare up prediction capacity in a 1 year follow-up.

In SLE patients, lupus nephritis constitutes one of the most severe organ manifestations that can lead to end-stage renal disease and even require renal replacement therapy. Indeed, renal involvement is the main predictor of mortality in SLE patients [30]. According to the literature, IgG anti-dsDNA autoantibodies titres and low complement C3/C4 are associated with lupus nephritis and recurrent disease flares [31,32]. However, it is also well known that IgG anti-dsDNA autoantibodies at high titres can be also observed in patients in remission [33]. In our study, the previously known correlation of hypocomplementemia with the presence of lupus nephritis (OR: 7.3) was confirmed. In relation to IgG anti-dsDNA autoantibodies, detected by CIA, high results were associated with articular and haematological involvement (OR: 6.3 for both). Regarding other major organ involvement, high SLE-ELISpot results were strongly associated with haematological disturbances (OR: 23.8), and the combination of high SLE-ELISpot results and hypocomplementemia was associated with articular involvement (OR: 6.3). The differences in these associations could be due to different pathogenic mechanisms but this fact must be confirmed in other studies including a higher number of patients.

During the follow-up of SLE patients, tools for flare risk prediction constitute a need not yet covered, which may facilitate better disease monitoring as well as an earlier treatment of patients. Hanaoka previously suggested that anti-dsDNA ELISpot may help to predict the risk of SLE flare ups in the following year [19]. The results of our study corroborate this suggestion, as a high SLE-ELISpot result showed an HR of 3.4 for SLE patients to have a flare up ($p = 0.043$). Beyond the prediction of flare risk, our results indicate that this prediction is significantly higher for flare ups with renal involvement (IIR: 6.5). Furthermore, the addition of hypocomplementemia to SLE-ELISpot brings an even better prediction capacity, increasing the HR for any kind of flare up and renal flare up to 5.2 and 32.9, respectively. As noted, SLE-ELISpot was better than CIA and CLIFT to predict a flare up at 1-year and even better for renal flare ups. Moreover, whereas the SLE-ELISpot positive predictive value concerning a flare was good (47.1% of patients with high results had a flare), the negative predictive value for ELISpot activity cut-off was even better (82.9% of low patients did not present a flare). Thus, the addition of SLE-ELISpot to the anti-dsDNA autoantibody determination in some complex SLE patients may be of interest.

Nevertheless, our study has some limitations. First, patients were not collected at SLE onset, most of them were under immunosuppressive treatments and we could not assess the impact of this condition on flare appearance. Second, the number of consecutively included was low. Our hospital is a reference centre in the diagnosis and treatment of patients with autoimmune diseases. This may be the reason for the high percentage of patients with overlapping syndromes due to the diagnostic and therapeutic complexity they entail. On the other hand, this overlap is not uncommon and is described in up to 20% of patients with SLE in the Registry of the Spanish Society of Rheumatology (RELBSE) [34]. We think that the type of patients included is a picture of daily clinical practice in real life. Third, we chose the SLEDAI-2K score to evaluate disease activity and is known that it

has some limitations, for example, it overemphasises some symptoms whereas others are absent. Moreover, SLEDAI-2K only scores the presence or absence of each item without a severity spectrum evaluation of them [35]. Fourth, the SLE-ELISpot assay is manual, tricky and time-consuming and requires properly trained personnel. For this reason, it cannot be used as an automatic daily-routine assay at a large scale. However, our study shows that for some specific patients who require a closer follow-up, SLE-ELISpot can provide valuable information regarding their clinical activity and may help physicians to make therapeutic decisions. For this reason, the fact that this work is based on consecutive clinical and laboratory monitoring SLE patients' samples is a remarkable strength. Another strength is that this study is made with the baseline ELISpot results, this allows the ASC study to be feasible. However, periodic and systematic ELISpot studies to know the evolution of specific B-cells may be of interest and it should be addressed. Besides, we designed this study with the objective to mimic physiological conditions, for this reason B cells were not pre-activated and the number of cells in the well was not normalised according to the B cell proportion of each patient. Although these results seem promising, they are derived from post-hoc analyses with a relative low number of patients and must be confirmed in larger cohorts.

Additionally, in recent years, some authors had studied the detection of antigen-specific B-cells by flow cytometry [36–38]. Since flow cytometry techniques are available in most immunology laboratories, it might be of interest to compare the presence of anti-dsDNA secreting cells detected by SLE-ELISpot with dsDNA-specific B-cells detected by flow cytometry. Moreover, B cell are somehow regulated by T cells, thus the study of both B and T-specific cells could be also of interest. In fact, in this study the use of PBMCs assure that all subpopulations are included.

In conclusion, according to our results, SLE-ELISpot assay may offer relevant and complementary information to that obtained by IgG anti-dsDNA autoantibodies quantification, particularly related to the risk of a new disease flare up in the 1-year follow-up but is not suitable to replace the IgG anti-dsDNA autoantibodies determination for SLE diagnosis. Indeed, this study suggests that the addition of the SLE-ELISpot assay to the current follow-up protocol may improve options for early using targeted therapies to reduce chronic organ damage in some patients despite standard of care therapy, based on the association of SLE-ELISpot over activity cut-off results with the presence of active disease or the risk of flare up, especially in the case of renal flare ups. Finally, larger prospective studies are needed to further confirm the association with clinical activity and the flare up predictability of the SLE-ELISpot assay.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm12041295/s1>, Table S1. Different conditions tested from the original ones in Hanaoka design. In bold, conditions selected for the ELISpot.

Author Contributions: Conceptualization, O.V., M.G.-O., E.R.-O. and A.L.; Methodology, A.P.-L., A.L. and N.D.M.; Validation, E.R.-O., O.V. and M.G.-O.; Investigation, A.P.-L., A.L. and N.D.M.; Statistical Analysis, A.P.-L.; Patient selection, R.C., S.P.-G. and G.B.; Patient evaluation, G.F., S.P.-G., L.F.Q., M.X. and G.M.L.; Data Curation, A.P.-L. and M.X.; Writing—Original Draft Preparation, A.P.-L.; Writing—Review & Editing, A.P.-L., A.L., E.R.-O., O.V., M.X., L.F.Q., G.E., R.C., S.P.-G., C.M.L. and M.G.-O.; Supervision, E.R.-O. and O.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a one year grant of the Hospital Clínic de Barcelona ("Emili Letang Award-2017") held by A.L.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona (LICB/2017/0876 on 16 January 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Acknowledgments: We thank Montserrat Plana (University of Barcelona) for useful technical and methodological discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Han, S.; Zhuang, H.; Shumyak, S.; Yang, L.; Reeves, W.H. Mechanisms of autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aringer, M.; Costenbader, K.; Daikh, D.; Brinks, R.; Mosca, M.; Ramsey-Goldman, R.; Johnson, S.R. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 1151–1159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Correa-Rodríguez, M.; Pocovi-Gerardino, G.; Callejas-Rubio, J.L.; Ríos-Fernández, R.; Martín-Amada, M.; Cruz-Caparrós, M.G.; Ortego-Centeno, N. Clinical and serological associations of autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Investig. Med.* **2021**, *69*, 1417–1425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tan, E.M.; Cohen, A.S.; Fries, J.F.; Masi, A.T.; McShane, D.J.; Rothfield, N.F.; Winchester, R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1982**, *25*, 1271–1277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1997**, *40*, 1725. [\[CrossRef\]](#)
- Petri, M.; Orbai, A.M.A.G. Derivation and Validation of Systemic Lupus International. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 2677–2686. [\[CrossRef\]](#)
- Gladman, D.D.; Ibañez, D.; Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 Responder Index-50 Website. *J. Rheumatol.* **2002**, *29*, 288–291.
- Gensous, N.; Marti, A.; Barnette, T.; Blanco, P.; Lazaro, E.; Seneschal, J.; Richez, C. Predictive biological markers of systemic lupus erythematosus flares: A systematic literature review. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, *19*, 238. [\[CrossRef\]](#)
- Rekvig, O.P. The Anti-DNA Antibodies: Their Specificities for Unique DNA Structures and Their Unresolved Clinical Impact—A System Criticism and a Hypothesis. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
- Mumtaz, I.M.; Hoyer, B.F.; Pannic, D.; Moser, K.; Winter, O.; Cheng, Q.Y.; Hiepe, F. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: Implications for the treatment of autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2012**, *39*, 180–188. [\[CrossRef\]](#)
- Dörner, T.; Jacobi, A.M.; Lipsky, P.E. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11*, 247. [\[CrossRef\]](#)
- Winter, O.; Musiol, S.; Schabrowsky, M.; Cheng, Q.; Khodadadi, L.; Hiepe, F. Analyzing pathogenic (double-stranded (ds) DNA-specific) plasma cells via immunofluorescence microscopy. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 1. [\[CrossRef\]](#)
- Hoyer, B.F.; Moser, K.; Hauser, A.R.; Peddinghaus, A.; Voigt, C.; Filat, D.; Hiepe, F. Short-lived Plasmablasts and Long-lived Plasma Cells Contribute to Chronic Humoral Autoimmunity in NZB/W Mice. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 1577–1584. [\[CrossRef\]](#)
- Yap, D.Y.H.; Chan, T.M. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis—Role in pathogenesis and effect of immunosuppressive treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Malkiel, S.; Barlev, A.N.; Afisha-Fregoso, Y.; Suurmond, J.; Diamond, B. Plasma Cell Differentiation Pathways in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mathian, A.; Gallegos, M.; Pascual, V.; Banchereau, J.; Koutouzov, S. Interferon- α induces unabated production of short-lived plasma cells in pre-autoimmune lupus-prone (NZB $\times$ NZW)F1 mice but not in BALB/c mice. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 863–872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chang, H.D.; Tokoyoda, K.; Hoyer, B.; Alexander, T.; Khodadadi, L.; Mei, H.; Radbruch, A. Pathogenic memory plasma cells in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2019**, *61*, 86–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, Z.; Zou, Y.R.; Davidson, A. Plasma cells in systemic lupus erythematosus: The long and short of it all. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 588–591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hanaoka, H.; Okazaki, Y.; Satoh, T.; Kaneko, Y.; Yasuoka, H.; Seta, N.; Kuwana, M. Circulating anti-double-stranded DNA antibody-secreting cells in patients with systemic lupus erythematosus: A novel biomarker for disease activity. *Lupus* **2012**, *21*, 1284–1293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Czerkinsky, C.C.; Nilsson, L.; Nygren, H.; Ouchterlony, Ö.; Tarkowski, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 109–121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kuwana, M.; Okazaki, Y.; Kaburaki, J.; Kawakami, Y.; Ikeda, Y. Spleen Is a Primary Site for Activation of Platelet-Reactive T and B Cells in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 3675–3682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Taddeo, A.; Khodadadi, L.; Voigt, C.; Mumtaz, I.M.; Cheng, Q.; Moser, K.; Hoyer, B.F. Long-lived plasma cells are early and constantly generated in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Powell, W.E.; Hanna, S.J.; Hocter, C.N.; Robinson, E.; Lewis, M.; Dunseath, C.; Wong, F.S. Detecting autoreactive B cells in the peripheral blood of people with type 1 diabetes using ELISPOT. *J. Immunol. Methods* **2019**, *471*, 61–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Tebruegge, M.; Ritz, N.; Koetz, K.; Noguera-Julian, A.; Seddon, J.A.; Welch, S.B.; Kampmann, B. Availability and use of molecular microbiological and immunological tests for the diagnosis of tuberculosis in Europe. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e0099129. [\[CrossRef\]](#)
25. Kaaijk, P.; Olivo Pimentel, V.; Emmelot, M.E.; Poelen, M.; Cevirgel, A.; Schepp, R.M.; de Wit, J. Children and Adults With Mild COVID-19: Dynamics of the Memory T Cell Response up to 10 Months. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 307.
26. Ruperto, N.; Hanrahan, L.M.; Alarcón, G.S.; Belmont, H.M.; Brey, R.L.; Brunetta, P.; Merrill, J.T. International consensus for a definition of disease flare in lupus. *Lupus* **2011**, *20*, 453–462. [\[CrossRef\]](#)
27. Weening, J.J.; D'agati, V.D.; Schwartz, M.M.; Seshan, S.V.; Alpers, C.E.; Appel, G.B.; Nagata, M. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 241–250. [\[CrossRef\]](#)
28. Weening, J.J.; D'agati, V.D.; Schwartz, M.M.; Seshan, S.V.; Alpers, C.E.; Appel, G.B.; Nagata, M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* **2004**, *65*, 521–530. [\[CrossRef\]](#)
29. Austin, H.A., III; Muenz, L.R.; Joyce, K.M.; Antonovych, T.A.; Kullick, M.E.; Klippel, J.H.; Balow, J.E. Prognostic factors in lupus nephritis: Contribution of renal histologic data. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 382–391. [\[CrossRef\]](#)
30. Yu, F.; Haas, M.; Glasscock, R.; Zhao, M.I. Redefining lupus nephritis: Clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 483–495. [\[CrossRef\]](#)
31. Pan, N.; Amigues, I.; Lyman, S.; Duculan, R.; Aziz, F.; Crow, M.K.; Kirou, K.A. A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months. *Lupus* **2014**, *23*, 293–298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Iseliou, K.; Gladman, D.D.; Su, J.; Urowitz, M.B. Advanced chronic kidney disease in lupus nephritis: Is dialysis inevitable? *J. Rheumatol.* **2020**, *47*, 1366–1373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Yurasov, S.; Tiller, T.; Tsuiji, M.; Velinzon, K.; Pascual, V.; Wardemann, H.; Nussenzweig, M.C. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2255–2261. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Riveros Frutos, A.; Holgado, S.; Sanvisens Bergé, A.; Casas, I.; Olivé, A.; López-Longo, F.J.; Rúa-Figueroa, I. Late-onset versus early-onset systemic lupus: Characteristics and outcome in a national multicentre register (RELESSEER). *Rheumatology* **2021**, *60*, 1793–1803. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ohmura, K. Which is the best SLL activity index for clinical trials? *Mod. Rheumatol.* **2021**, *31*, 20–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tzovara, I.; Papadatou, I.; Tzanoudaki, M.; Spoulou, V. Development of a novel flow cytometry method for detecting pneumococcal-specific B cells. *Cytom. Part A* **2022**, *101*, 588–596. [\[CrossRef\]](#)
37. Newell, K.L.; Waldman, M.J.; Thomas, S.J.; Endy, T.P.; Waickman, A.I. Simultaneous analysis of antigen-specific B and T cells after SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cytom. Part A* **2022**, *101*, 474–482. [\[CrossRef\]](#)
38. Hernandez-Davies, J.L.; Dollinger, L.P.; Pone, L.J.; Felgner, J.; Liang, L.; Strohmeier, S.; Davies, D.H. Magnitude and breadth of antibody cross-reactivity induced by recombinant influenza hemagglutinin trimer vaccine is enhanced by combination adjuvants. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9198. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publicació 2

Could the IgA isotype provide additional information in systemic sclerosis patients? A retrospective study entailing IgA isotyping in a Mediterranean systemic sclerosis cohort

A. Pérez-Isidro, G.M. Lledó-Ibáñez, N. de Moner, M. Torradeflot, M.J. Martínez, G. Espinosa, M. Tena Campos, M. Grundhuber, O. Viñas, E. Ruiz-Ortiz

Clinical and Experimental Rheumatology 2023; Online ahead of print

(doi: [10.55563/clinexprheumatol/qijvcj](https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/qijvcj))

Impact Factor (2022): 3.7

2on tercil (20/34) de la categoria *Rheumatology* (JCR)

H Index (2022): 104; SJR (2022): 0.975

2on tercil (22/64) de la categoria *Rheumatology* (SJR)

2on tercil (93/213) de la categoria *Immunology* (SJR)

2on tercil (77/204) de la categoria *Immunology and Allergy* (SJR)

Could the IgA isotype provide additional information in systemic sclerosis patients? A retrospective study entailing IgA isotyping in a Mediterranean systemic sclerosis cohort

A. Pérez-Isidro^{1,2}, G.M. Lledó-Ibáñez^{2,3,4}, N. de Moner¹, M. Torradeflot¹, M.J. Martínez¹, G. Espinosa^{2,3,4}, M. Tena Campos⁵, M. Grundhuber⁶, O. Viñas^{1,2}, E. Ruiz-Ortiz^{1,2}

¹Department of Immunology, Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB), Hospital Clínic, Barcelona, Spain;

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain;

³Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona, Spain;

⁴Reference Centre for Systemic Autoimmune Diseases (CSUR) of the Spanish Health System, Barcelona, Spain; ⁵Thermo Fisher Scientific, Cornellà de Llobregat, Spain;

⁶Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Germany.

Abstract

Objective

Anti-CENP-B (ACA), anti-topoisomerase I (ATA) and anti-RNA polymerase III (RP3) autoantibodies are included in the 2013 SSc-ACR/EULAR classification criteria. The detection of additional autoantibodies is of interest when those are negative. Additionally, we wonder if the IgA isotype might play a role in SSc. The aims of the study were to assess the prevalence of ACA, ATA, RP3, and Ro52 autoantibodies of IgG and IgA isotype and to describe their association with clinical manifestations in a cohort of patients with SSc.

Methods

Samples from 97 patients with SSc fulfilling the 2013 ACR/EULAR classification criteria, and 50 blood donors were included and tested for IgA and IgG isotypes of ACA, ATA, RP3, and Ro52 by FEIA.

Results

The prevalence of IgG+IgA isotypes for the same specificity was 62.5%, 82.6%, 80.0%, 36.8%, for ACA, ATA, RP3 and Ro52, respectively. Isolated IgG was present in 35.4%, 13.0%, 20.0% and 42.1% of patients for ACA, ATA, RP3 and Ro52, respectively. Only six patients were isolated IgA for a unique specificity. Clinically, ILD tended to be associated with ATA-IgG and ATA-IgG+IgA, telangiectasias with ACA-IgG+IgA and arthritis with ACA-IgA. Indeed, digital ulcers were more frequent in ATA-IgG patients.

Conclusion

Most of the patients presented ACA, ATA, or RP3 autoantibodies of IgA isotype in addition to IgG. Regarding clinical relevance, Ro52-IgG+IgA and ACA-IgG had a tendency towards sineSSc phenotype, while ACA-IgG+IgA to lcSSc phenotype. Thus, if confirmed, the determination of ACA-IgA could provide a tool to stratify patients according to the cutaneous phenotype.

Key words

systemic sclerosis, IgA autoantibodies, interstitial lung disease

IgA isotyping in a Mediterranean SSc cohort / A. Pérez-Isidro et al.

Albert Pérez-Isidro, MSc
 Gema M. Lledó-Ibáñez, MD
 Noemí de Moner, RT
 Maria Torradeflot, RT
 Maria José Martínez, RT
 Gerard Espinosa, MD, PhD
 Mercè Tena Campos, PhD
 Maresa Grundhuber, PhD
 Odette Viñas, MD
 Estíbaliz Ruiz-Ortiz, PhD
 Please address correspondence to:
 Estíbaliz Ruiz-Ortiz,
 Department of Immunology,
 Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB),
 Hospital Clínic,
 08036 Barcelona, Spain.
 E-mail: esruiz@clinic.cat
 and
 Odette Viñas,
 (same postal address)
 E-mail: ovinyas@clinic.cat

Received on June 21, 2023; accepted in
 revised form on September 26, 2023.

© Copyright CLINICAL AND
 EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2023.

Competing interests: M. Tena is
 Autoimmunity Scientific Advisor at
 Thermo Fisher Scientific, Spain.
 M. Grundhuber is employee of Thermo
 Fisher Scientific, Germany. All other
 authors declare no competing interests.

Introduction

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare and chronic systemic autoimmune rheumatic disease (SARD) characterised by the generation of autoantibodies, with typical vascular manifestations such as Raynaud's phenomenon (RP), pulmonary hypertension (PH), and scleroderma renal crisis (SRC). On the other hand, fibrosis is the result of an imbalance between antifibrotic and profibrotic factors, leading to disturbances in the skin and pulmonary interstitium (1). The incidence in women is 4-9 times higher than in men (2). Patients with SSc have been classified, according to the extent of skin involvement, into three types: limited cutaneous SSc (lcSSc), diffuse cutaneous SSc (dcSSc), and SSc sine-scleroderma (sineSSc) (3). Although RP is the most prevalent clinical symptom at the beginning of the disease, severe organ manifestations including digital ulcers, PH, interstitial lung disease (ILD), and SRC, have been traditionally associated with the cutaneous extension (4). The presence of PH is more prevalent in patients with lcSSc whereas ILD mainly affects patients with dcSSc. On the other hand, sineSSc patients, in which skin involvement is absent, have less severe disease than lcSSc patients (5).

Humoral immune response seems to play an important role in the pathogenesis of SSc. Anti-nuclear autoantibodies (ANA), detected by indirect immunofluorescence (IIF), are a hallmark of SSc and are found in almost all SSc patients (6, 7). Different types of SSc-specific autoantibodies have been described, being anti-centromere (ACA) IgG, anti-topoisomerase I or Scl70 (ATA) IgG and anti-RNA polymerase 3 (RP3) IgG the most prevalent ones, accounting for approximately 70-80% of patients (8). Moreover, these three IgG autoantibodies have been included in the 2013 American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) classification criteria (3). Additional autoantibodies specific for or associated with SSc are anti-Th/To, anti-U3-RNP/fibrillarin, anti-Ku, anti-PM-Scl, anti-NOR90, anti-PDGFR or anti-Ro52/TRIM21 (Ro52) (4, 9, 10).

Some studies have shown that classification according to autoantibodies positivity is as strongly associated with the clinical manifestations as the categorization into cutaneous subtypes (11, 12). In this sense, ATA has been associated with the dcSSc phenotype and the presence of ILD, with a worse prognosis. In contrast, ACA has been associated with the lcSSc phenotype and the presence of PH with a better prognosis although PH is one of the most prevalent causes of mortality in SSc patients. Additionally, RP3 has been associated with an increased risk of SRC and synchronous cancer and, in some studies, with a rapidly progressive ILD (5, 11).

In clinical practice, specific-SSc autoantibodies positivity is based on the evaluation of autoantibodies of the IgG isotype. The determination of autoantibody isotypes besides IgG is restricted to a few autoimmune diseases, such as IgA in relation to celiac disease, or IgM in the study of antiphospholipid syndrome or rheumatoid arthritis. However, in recent years, several studies have explored the role of the different isotypes of known autoantibodies in autoimmune diseases, such as SSc or rheumatoid arthritis (13-20). In SSc patients, only ACA-IgG and ATA-IgM had been associated with a higher degree of microangiopathy when defined by capillaroscopy (21). Additionally, both ACA-IgG and ACA-IgM had also been related to a definite SSc diagnosis. Moreover, higher levels of ACA-IgG were associated with disease progression to definite SSc within two years (22). In contrast, no relevant findings have been reported for the IgA isotype (21, 22).

On the other hand, the Ro52 autoantibodies are one of the most frequent in SARD, including systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), neonatal lupus erythematosus (NLE), and subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) despite not being specific for any disease. Furthermore, Ro52 has been associated with higher prevalence and worse prognosis of ILD in patients with SS, SSc, inflammatory myopathy, and mixed connective tissue disease (23, 24). In the Canadian Scleroderma Research Group study including 963 patients with SSc,

Ro52 autoantibodies (20.1%) were the second most common autoantibody after ACA (35.2%) followed by ATA and RP3 (15.6% and 18.6%, respectively) (25). Additionally, Ro52 autoantibodies were strongly associated with ILD (OR 1.53) and overlap syndrome (OR 1.75). Furthermore, Ro52 autoantibodies were detected in combination with ACA (23.4%), ATA (12.7%), and RP3 (16.0%) (26). In a small study of 62 patients with definite and suspected SARD diagnosis, isolated Ro52 has been hypothesised to be associated with a milder phenotype of undifferentiated connective tissue disease (27). Additionally, a large tri-nation cohort study with 1574 SSc patients, Ro52 monospecific positivity (n=103) was associated with ILD (OR 2.70) in comparison with Ro52 negative patients (n=1174). Of note, they were at significantly increased risk of death (25). Improved biomarkers for early diagnosis and prognosis are still needed. Nowadays, cutaneous phenotype (lcSSc and dcSSc) and autoantibody profile could give some information to the clinicians but around 20% of patients are still negative for the autoantibodies included in the SSc classificatory criteria (SSc-cc negative autoantibodies group). Thus, only few patients are being diagnosed in very early stages and without a definite SSc diagnosis nor a clear cutaneous phenotype. The aims of the present study were to assess the prevalence of ACA, ATA, RP3, and Ro52 autoantibodies of IgG and IgA isotype and to describe their association with clinical manifestations in a cohort of patients with SSc.

Materials and methods

Patients

Sera samples from 97 patients with SSc fulfilling the 2013 ACR/EULAR classification criteria were collected at the Department of Autoimmune Diseases of Hospital Clinic, Barcelona. All patients are included in the Spanish Scleroderma Registry (RESCLE). Clinical data including cutaneous phenotype, peripheral vascular and musculoskeletal manifestations, and gastrointestinal tract, lung, and renal involvement were reviewed from electronic health

records. In addition, 50 serum samples from blood donors were analysed. Ethics board approval was obtained from our institution (Hospital Clinic, Barcelona, Spain, ref. HCB/2019/0852). Written informed consent was obtained from all patients and blood donors.

Detection of autoantibodies

Serum samples were tested for the presence of IgA and IgG isotypes of ACA, ATA, RP3, and Ro52 by fluorescence enzyme-linked immunoassay (FEIA) using the EliA™ platform (Thermo Fisher Scientific, Sweden). Notably, the IgA isotype was detected using a prototype assay with the EliA™ system. Tests were run in a Phadia 250 system (Thermo Fisher Scientific, Sweden). In accordance with the established standard protocols, a calibration curve for each isotype was included to calculate the defined units of autoantibodies measured with commercially available assays or the concentration of autoantibodies measured with prototype assays, which have no defined units. IgG and IgA positive and negative controls were included in each tests round.

The cut-off value for the IgG isotype (ACA, ATA, RP3, and Ro52 autoantibodies) used in this study was 7 U/mL, according to the manufacturer's instructions. The cut-off value for the IgA isotypes (prototype reagents; ACA, ATA, RP3, and Ro52 autoantibodies) was calculated using the results obtained from the blood donor samples (n=50). A concentration of 1.65 µg/L was chosen as the cut-off for all biomarkers (giving ≥98% specificity for blood donors). For both IgG and IgA, results were considered negative below the cut-off, low positive between 1 and 5 times the cut-off, and high positive above 5 times the cut-off.

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics for Windows, version 23 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) and GraphPad Prism for Windows, version 8.3.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) were used for statistical analyses. Results with *p* values <0.05 were considered statistically significant. Continuous

data were described by the mean and standard deviation or median and 25th-75th interquartile range (IQR), according to their distribution. Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages. Differences in proportions were analysed using the Fisher's exact test. Differences in means of continuous variables were analysed using the parametric Student *t* test or the Mann-Whitney nonparametric *U* test when the variable distribution was not normal. Associations between categorical variables were determined using the Fisher's exact test. The relative measure of an effect was expressed as the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) when considering autoantibody positivity as the exposure. The multiple comparisons results were interpreted correcting with a False Discovery Rate value of 0.05.

Results

The patient cohort included 97 patients, 92 of whom were women (94.8%). The mean age of the patients at diagnosis was 49.5 years. The mean disease duration since diagnosis was 7 years and 12.7 years since the first non-Raynaud symptom related to SSc (Table I). Fifty-five patients (56.7%) presented a lcSSc phenotype, 15 (15.5%) a dcSSc, and 27 (27.8%) a sineSSc phenotype (Fig. 1). SSc criteria autoantibodies (IgG isotype) distribution in cutaneous phenotypes is shown in Figure 1.

Prevalence of autoantibodies included in classification criteria (IgG isotype)

ACA (48.5%) was the most prevalent autoantibody in our cohort, whereas ATA and RP3 were present in 22.7% and 5.2% of the patients, respectively. Only one patient was double positive for ATA (197.4 U/mL) and RP3 (15.2 U/mL). Twenty-four (24.7%) patients were negative for the three autoantibodies included in classification criteria (Fig. 2) but all of them were ANA positive by IIF on HEp-2 cells.

Clinical characteristics

The demographic and clinical characteristics of the whole cohort according to the presence of autoantibodies included in the classification criteria

IgA isotyping in a Mediterranean SSc cohort / A. Pérez-Isidro et al.**Table I.** Demographic characteristics, cutaneous phenotype, and clinical manifestations of the patients with systemic sclerosis according to SSc-criteria autoantibodies.

	SSc cohort (n=97)	IgG ACA positive (n=47)	IgG ATA positive (n=22)	IgG RP3 positive (n=5)	Negative SSc-criteria autoantibodies (n=24)	p value
Demographic characteristics						
Age at SSc diagnosis, (years)	49.5 ± 15.9	54.1 ± 15.9	46.2 ± 12.0	52.2 ± 12.1	43.1 ± 17.5	0.052
Female	92 (94.8%)	47 (100%)	20 (90.9%)	5 (100%)	21 (87.5%)	0.059
Disease duration, since first non-Raynaud symptom, (years)	12.7 ± 12.3	13.0 ± 12.9	14.5 ± 12.5	5.8 ± 6.6	11.4 ± 11.9	0.518
Disease duration since diagnosis, (years)	7.0 ± 10.0	6.7 ± 10.5	9.1 ± 10.4	4.4 ± 7.2	5.8 ± 9.2	0.711
Follow-up time, (years)	6.5 ± 1.5	6.6 ± 1.6	6.0 ± 1.3	7.2 ± 1.3	6.5 ± 1.6	0.165
Anti-nuclear autoantibodies	97 (100%)	47 (100%)	22 (100%)	5 (100%)	24 (100%)	1.000
Compatible IIF pattern (28)	71/73 (97.3%)	46 (97.9%)	21 (95.5%)	5 (100%)	---	0.786
Clinical manifestations						
Raynaud's phenomenon	94 (96.9%)	47 (100%)	22 (100%)	5 (100%)	21 (87.5%)	0.042
Digital ulcers	18 (18.6%)	7 (14.9%)	8 (36.4%)	0	3 (12.5%)	0.129
Telangiectasias	47 (48.5%)	28 (59.6%)	12 (54.5%)	1 (20.0%)	6 (25.0%)	0.025
Calcinosis	9 (9.3%)	5 (10.6%)	2 (9.1%)	1 (20.0%)	1 (4.2%)	0.495
Arthritis	10 (10.4%) (n=96)	4 (8.7%) (n=46)	1 (4.5%)	1 (20.0%)	4 (16.7%)	0.870
Myositis	4 (4.2%) (n=96)	0 (n=46)	0	0	4 (16.7%)	0.017
Oesophageal involvement	62 (65.3%) (n=95)	32 (68.1%)	14 (66.7%) (n=21)	3 (75.0%) (n=4)	14 (58.3%)	0.870
Interstitial lung disease (ILD)	43 (44.3%)	13 (27.7%)	18 (81.8%)	3 (60.0%)	10 (41.7%)	<0.001
Severe ILD (FVC <70%)	17 (17.5%)	6 (12.8%) 46.2% ILD	5 (22.7%) 27.8% ILD	1 (20.0%) 33.3% ILD	5 (20.8%) 50.0% ILD	0.536
Pulmonary hypertension	16 (24.2%) (n=66)	7 (21.9%) (n=32)	2 (14.3%) (n=14)	1 (20.0%)	6 (37.5%) (n=16)	0.462
Scleroderma renal crisis	1 (1.0%)	0	1 (4.5%)	0	0	0.268
Neoplasia	16 (16.7%) (n=96)	9 (19.6%) (n=46)	3 (13.6%)	2 (40.0%)	3 (12.5%)	0.728

Results of quantitative variables are expressed as mean ± standard deviation and those of qualitative variables as number and percentage. Information in parenthesis indicates number of column total patients for whom clinical data is available.

(ACA-IgG, ATA-IgG, and RP3-IgG) are summarised in Table I. There were no differences in the age at SSc diagnosis, sex or SSc disease duration between SSc-criteria groups. The lcSSc subtype (56.7%) was the most prevalent skin phenotype in our cohort. The dcSSc subtype (15.5%) was uniformly present in the ATA-IgG, RP3-IgG, and SSc-cc negative autoantibodies group but it was absent in the ACA-IgG group ($p<0.001$). On the other hand, sineSSc subtype (27.8%) was mostly represented in ACA-IgG and SSc-cc negative autoantibodies group but

without statistically significant difference (Table I).

Regarding clinical manifestations, telangiectasias were significantly more prevalent in the ACA-IgG and ATA-IgG groups than in the RP3-IgG and SSc-cc negative autoantibodies group ($p=0.025$). In contrast, myositis was only present in SSc-cc negative autoantibodies group ($p=0.017$) being three of these four patients positive for anti-Ku and the other one positive for anti-U3-RNP/fibrillarin autoantibodies. All of them were negative for Ro52 autoantibodies. Moreover, ILD was more prevalent in patients with ATA-IgG than in other groups ($p<0.001$).

alant in patients with ATA-IgG than in other groups ($p<0.001$).

Prevalence of IgA isotype of ACA, ATA and RP3 autoantibodies

Regarding IgA autoantibodies, 55 out of 97 (56.7%) patients were IgA positive and most of them (53/55; 96.4%) were double positive, IgG and IgA, for the same specificity, being 30 ACA (groups 1 to 7; Fig. 2), 19 ATA (groups 11 to 20; Fig. 2) and 4 RP3 (groups 24 to 26; Fig. 2). In addition, only two patients were single positive for IgA isotype, one for ACA (lcSSc) and an-

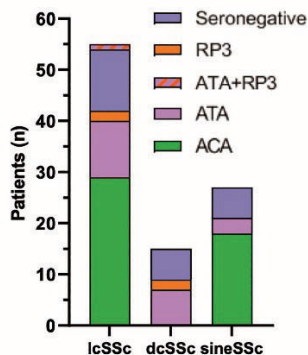


Fig. 1. SSc criteria autoantibody (ACA, ATA and RP3) from IgG isotype distribution in the three different cutaneous phenotypes.

ACA: anti-centromere; ATA: anti-topoisomerase-1; dcSSc: diffuse cutaneous phenotype; lcSSc: limited cutaneous phenotype; sineSSc: sine scleroderma phenotype; RP3: anti-RNA polymerase III.

other for ATA (lcSSc) (groups 10 and 23, respectively; Fig. 2). Therefore, the SSc-cc negative autoantibodies group (n=24) was reduced by two patients considering IgA isotype (n=22; groups 27 to 30) (Fig. 2).

Prevalence of Ro52 autoantibodies

The prevalence of Ro52 autoantibodies in our cohort was 19.6% (19/97 patients). In contrast to criteria autoantibodies, only 7 patients (36.8%) were double positive, IgG and IgA (groups 3, 4 and 27; Fig. 2), whereas 8 (42.1%) (groups 7, 9, 15, 16, 26, 28 and 29; Fig. 2) were isolated IgG and 4 (21.1%) (groups 13, 14 and 18) (Fig. 2) isolated IgA.

There were no significant differences in the prevalence of Ro52 (IgG and/or IgA) among the four different groups (14.6%, 26.1%, 25.0% and 22.7% in

ACA, ATA, RP3, and SSc-cc negative autoantibodies group, respectively; $p=0.661$).

Autoantibody combinations

Regarding ACA autoantibodies, when IgG and IgA isotypes were present (n=30; groups 1 to 7) (Fig. 2), IgG titres were high and IgA titres were low in 73.3% of patients. In relation to ATA, when both isotypes were present (n=19; groups 11 to 20) (Fig. 2), IgG and IgA titres were high in 68.4% of patients. Whereas for RP3, we cannot observe a clear trend with 2 patients double positive at high titres for both isotypes, one patient low positive for both isotypes and one patient low for IgG and high for IgA (n=4; groups 24 to 26) (Fig. 2). Finally, all Ro52 double positive patients had high IgG and low IgA titres.

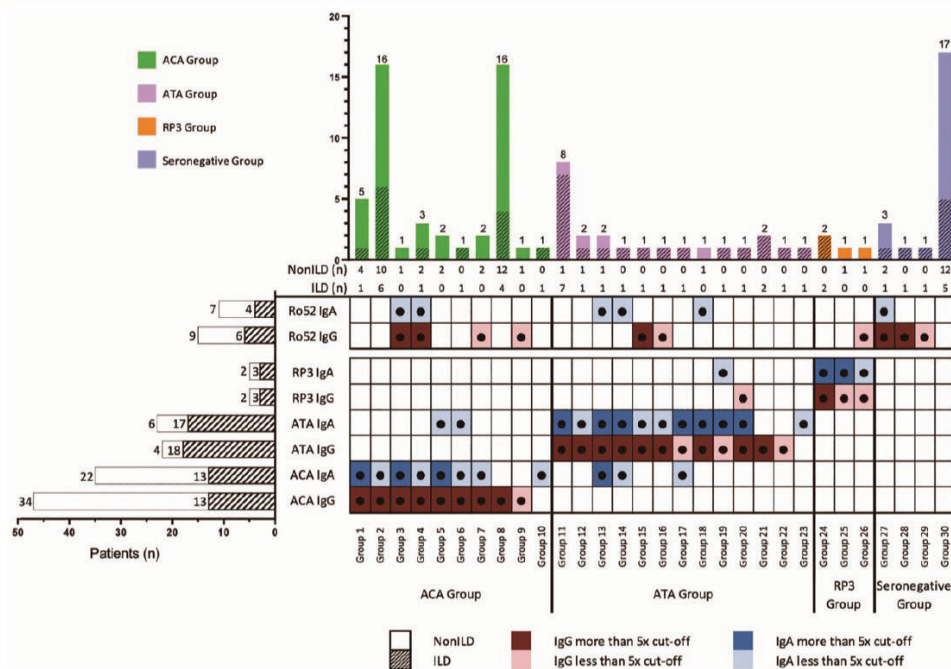


Fig. 2. UpSet plot. Combination of autoantibodies in SSc cohort. Bars on the left indicate number of patients with and without ILD with positive antibody. Columns represent number of patients with and without ILD presenting the same autoantibody profile. Green columns indicate ACA group, purple columns ATA group, orange columns RP3 group, and blue columns SSc-cc negative autoantibodies group. Autoantibody positive signals are divided into high (more than 5x cut-off) and low titres (less than 5x cut-off).

ACA: anti-centromere; ATA: anti-topoisomerase-1; ILD: interstitial lung disease; RP3: anti-RNA polymerase III.

IgA isotyping in a Mediterranean SSc cohort / A. Pérez-Isidro et al.

When only patients with isolated IgG or IgA positivity were analysed, 20 out of 28 (71.4%) of those IgG positive were at high titres while 12 out of 14 (85.7%) isolated IgA positive patients were positive at low IgA titres.

Among the patients who are positive for several targets (ACA, ATA and/or RP3), 8 patients were double positive for IgA autoantibodies (Groups 5, 6, 13, 14, 17, 19), whereas only 1 patient was double positive for 2 IgG autoantibodies (high titres of ATA and low titres of RP3; group 20). Positivity to more than one autoantibody (including Ro52 autoantibodies as well as SSc-criteria autoantibodies) was more frequent in ATA (9/23; 39.1%. Groups 13 to 20) patients than in those with ACA (10/48; 20.8%. Groups 3 to 7 and 9) (Fig. 2).

Regarding Ro52, there were no differences in Ro52 prevalence (19.8% vs. 20.8%) between positive patients for the SSc autoantibodies included in the classification criteria (groups 1 to 9, 11 to 22 and 24 to 26) and SSc-cc negative autoantibodies group (groups 10, 23 and 27 to 30), respectively (Fig. 2).

Association with clinical manifestations

Although some tendencies were observed, after correcting for multiple comparisons, any association reached statistical significance.

Considering the cutaneous phenotype, ACA-IgG+IgA tended to lcSSc and ATA-IgG to dcSSc phenotype. ACA-IgG and Ro52-IgG+IgA had a tendency towards sineSSc (non-adjusted *p*-values: 0.029, 0.004, 0.005 and 0.017, respectively).

Regarding other clinical manifestations, ATA-IgG and ATA-IgG+IgA positivity tended to be more prevalent in patients with ILD (non-adjusted *p*-value: 0.084 and 0.001). ACA-IgG+IgA had a tendency towards telangiectasias and ACA-IgA towards arthritis (non-adjusted *p*-value: 0.027 and 0.083). Moreover, ATA-IgG positive patients had a higher prevalence of digital ulcers.

Three out of 5 (60.0%) Ro52 monospecific patients (groups 27, 28 and 29) had ILD whereas 35 out of 78 (44.9%)

Ro52 negative patients had ILD (Fig. 2). These differences were not statistically significant (OR: 1.84; *p*=0.656).

We did not find statistically significant clinical association according to the presence or absence of Ro52 autoantibodies in positive patients for autoantibodies included in the SSc classificatory criteria (groups 1 to 9, 11 to 22 and 24 to 26). However, Ro52 presence tended to be more frequent in dcSSc patients (28.6% in Ro52 positive vs. 8.5% in Ro52 negative; *p*=0.062) while neoplasia tended to be more frequent in Ro52 negative patients (22.0% in Ro52 negative vs. 0% in Ro52 positive; non adjusted *p*-value=0.059).

Interestingly, when comparing the patients with low titres of autoantibodies (groups 9, 10, 22, 23, 26 and 29) with negative patients for ACA, ATA, RP3 and Ro52 (group 30), the prevalence of ILD was higher in low titers group (4/6; 66%) than in negative patients (5/17; 29.4%) but not statistically significant (*p*=0.162) (Fig. 2).

Discussion

This study described the prevalence of IgG and IgA isotypes of SSc criteria autoantibodies and their association with clinical manifestations in a Spanish cohort of SSc patients. Moreover, Ro52 autoantibodies were also analysed. The main finding of this study is that most of the SSc patients presented with ACA, ATA, or RP3 autoantibodies of IgA isotype in addition to IgG.

According to SSc-criteria autoantibodies, in the sample analysed within our cohort, the prevalence of ACA was higher and the prevalence of ATA was lower than those from the EUSTAR registry (29), which included 8432 patients with SSc (ACA 48.5% vs. 37.0%; *p*=0.002 and ATA 23.7% vs. 39.0%; *p*=0.026, respectively). In contrast, RP3 prevalence in our cohort was similar to that of the EUSTAR registry cohort (5.2% vs. 4.0%; *p*=0.593). As is known, most of the SSc patients are monospecific for the autoantibodies included in the 2013 SSc classification criteria (10). According to previous studies describing double positivity for autoantibodies targeting different antigens in only a few SSc patients (8), we

only found one double positive patient with high ATA-IgG and low RP3-IgG, and these results were confirmed by other methods.

The performed study showed that IgA isotype autoantibodies were present in many patients with SSc. The high prevalence of ACA-IgA and ATA-IgA in the presence of the IgG isotype, as previously described in other studies (30-33) was confirmed in our study. Most patients presented double positivity for the IgG and IgA isotypes for the same specificity, while the number of patients uniquely positive for IgA positivity was very low. This fact undermines the opportunity to minimise the seronegative gap of SSc criteria with IgA isotyping but may still provide more accurate information about the clinical association and prognosis.

Regarding clinical relevance, the most significant finding was the tendency for ACA-IgG positivity in patients with the sineSSc phenotype, while ACA-IgG+IgA was more frequent in the lcSSc phenotype. Moreover, Ro52-IgG+IgA had also a tendency towards the presence of sineSSc. However, ACA and Ro52 were independent (*p*=0.124). Although these tendencies must be confirmed in other studies, the determination of ACA-IgA could provide an extra tool to stratify patients according to the cutaneous phenotype. However, in this sense, we found that ACA-IgG+IgA was more prevalent in patients with telangiectasias, and isolated ACA-IgA in patients with arthritis.

As reported previously (10), Ro52 appeared concomitant with ACA, ATA, or RP3 autoantibodies in 20% of patients with SSc-criteria in our cohort. The prevalence of Ro52 was similar among the groups with ACA, ATA, RP3, or SSc-cc negative autoantibodies patients. Monospecific Ro52 (without SSc-criteria autoantibodies) has been associated with ILD (OR 2.70) (25). However, in our study, ILD prevalence was similar regardless of the status of Ro52 (monospecific versus Ro52 negative). In contrast to other SSc cohorts (25,26), Ro52 prevalence in our study (19.6%) was lower than ACA (48.5%) and ATA (22.7%) prevalence. As is common knowledge, the differ-

ent autoantibodies detection methods, including those to detect anti-Ro52, have different sensitivity (34,35) and this fact could account for these differences. Interestingly, we found that positivity to Ro52-IgG+IgA as well as ACA-IgG tended to be more frequent in sineSSc patients. Conversely, we did not find differences in the proportion of Ro52-IgG+IgA between patients with isolated ACA-IgG and those negative for ACA-IgG ($p=0.124$). Therefore, these findings could indicate that ACA-IgG and Ro52-IgG+IgA may have an independent role in the sineSSc phenotype, which may characterise different sineSSc clinical phenotypes.

Patients with low titers (1-5x cut-off) of any of the evaluated autoantibodies, when compared with negative patients, had a higher prevalence of ILD (66% vs. 29%; $p=0.162$). Although there was a small number of patients and differences were not statistically significant, this result may point out that clinicians have to be aware that even low titer autoantibodies could be relevant, and these patients could have an increased risk to develop ILD.

A limitation of our study is the low number of patients with SSc and, subsequently, the low number of patients within each group (ACA, ATA, RP3 and lcSSc, dcSSc, sineSSc). Due to the high prevalence of double IgG+IgA positive patients in ACA and even more in ATA patients, it was difficult to decipher the role of the IgA isotype, and some tendencies resulting from association analyses should be considered carefully and confirmed in other studies. However, our findings suggest a role for Ro52 in addition to ACA in the sineSSc phenotype that could be related to the absence of ACA-IgA or the presence of the Ro52-IgA isotype. Another important limitation is that autoantibodies had only been assessed using one technique, but most of the results were in accordance with IIF, and the discordant results were within the equivocal range. Additionally, only the three autoantibodies included in the classification criteria were assessed. However, there are other autoantibodies detected in patients with SSc, such as U3-RNP/fibrillarin, Th/To, PM-Scl,

Ku, NOR90, that were not tested because its low prevalence, and the corresponding need of larger cohorts for a thorough analysis. As strength, our cohort could be representative of the Mediterranean or southern European SSc population. The differences with the EUSTAR registry may also be due to geographical divergence.

The high IgG and IgA positivity prevalence makes us consider the sequential appearance of these autoantibodies since the very first symptoms of the disease, or even before, and if they are associated with one or other SSc clinical phenotype. However, as our study is retrospective and only includes well-established SSc diagnosed patients resulting in a high prevalence of autoantibodies. For these reasons, these questions should be addressed in subsequent prospective studies including longitudinal sampling of patients since first SSc symptoms for confirmation. These prospective studies will highlight the diagnosis power of IgA isotyping. Thus, larger studies are needed to confirm the observed tendencies between autoantibodies positivity and clinical findings, and a prospective study, including early SSc or recently diagnosed "definite SSc" patients, may be mandatory.

References

1. MOUAWAD JE, FEGHALI-BOSTWICK C: The Molecular Mechanisms of Systemic Sclerosis-Associated Lung Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(3): 2963. <https://doi.org/10.3390/ijms24032963>
2. FERRI C, DE ANGELIS R, GIUGGIOLI D *et al.*: Geographical heterogeneity of clinical and serological phenotypes of systemic sclerosis observed at tertiary referral centres. The experience of the Italian SIR-SPRING registry and review of the world literature. *Autoimmun Rev* 2022; 21(10): 103159. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103159>
3. VAN DEN HOOGEN F, KHANNA D, FRANSSEN J *et al.*: 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 2013; 65(11): 2737-47. <https://doi.org/10.1002/art.38098>
4. MAHLER M, HUDSON M, BENTOW C *et al.*: Autoantibodies to stratify systemic sclerosis patients into clinically actionable subsets. *Autoimmun Rev* 2020; 19(8): 102583. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102583>
5. SÁNCHEZ-CANO D, ORTEGO-CENTENO N, CALLEJAS JL *et al.*: Interstitial lung disease in systemic sclerosis: data from the span-

- ish scleroderma study group. *Rheumatol Int* 2018; 38(3): 363-74. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3916-x>
6. KUWANA M, GIL-VILA A, SELVA-O'CALLAGHAN A: Role of autoantibodies in the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in autoimmune rheumatic disorders. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2021; 13: 1759720X2110324. <https://doi.org/10.1177/1759720X211032457>
7. CHEPY A, BOUREL L, KOETHER V, LAUNAY D, DUBUCQUOI S, SOBANSKI V: Can Antinuclear Antibodies Have a Pathogenic Role in Systemic Sclerosis? *Front Immunol* 2022; 13: 1-16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.930970>
8. CLARK KEN, CAMPOCHIARO C, HOST LV *et al.*: Combinations of scleroderma hallmark autoantibodies associate with distinct clinical phenotypes. *Sci Rep* 2022; 12(1): 11212. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15062-4>
9. PATTERSON KA, ROBERTS-THOMSON PJ, LESTER S *et al.*: Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(12): 3234-44. <https://doi.org/10.1002/art.39316>
10. MEHRA S, WALKER J, PATTERSON K, FRITZLER MJ: Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2013; 12(3): 340-54. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.05.011>
11. SIMEÓN-AZNAR CP, FONOLLOSA-PLÁ V, TOLOSA-VILELLA C *et al.*: Registry of the Spanish Network for Systemic Sclerosis: Clinical Pattern According to Cutaneous Subsets and Immunological Status. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41(6): 789-800. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2011.10.004>
12. WALKER UA, TYNDALL A, CZIRJAK L *et al.*: Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(6): 754-63. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.062901>
13. SOLOMON JJ, MATSON S, KELMENSEN LB *et al.*: IgA Antibodies Directed Against Citrullinated Protein Antigens Are Elevated in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2020; 157(6): 1513-21. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.12.005>
14. CASTELLANOS-MOREIRA R, RODRÍGUEZ-GARCÍA SC, GOMARA MJ *et al.*: Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis* 2020; 79(5): 587-94. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216709>
15. JOSHUA V, HENSVDL AH, REYNISDOTTIR G *et al.*: Association between number and type of different ACPA fine specificities with lung abnormalities in early, untreated rheumatoid arthritis. *RMD Open* 2020; 6(2): e001278. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001278>
16. GRÖNWALL C, LILJEFORS L, BANG H *et al.*: A Comprehensive Evaluation of the Relationship Between Different IgG and IgA Anti-Modified Protein Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2021;

IgA isotyping in a Mediterranean SSc cohort / A. Pérez-Isidro et al.

- 12(May): 1-22.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627986>
17. SIEGHART D, PLATZER A, STUDENIC P *et al.*: Determination of Autoantibody Isotypes Increases the Sensitivity of Serodiagnostics in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2018; 9: 876.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00876>
 18. ENGLAND BR, DURYEE MJ, ROUL P *et al.*: Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts and Antibody Responses in Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol* 2019; 71(9): 1483-93.
<https://doi.org/10.1002/art.40900>
 19. OKA S, HIGUCHI T, FURUKAWA H *et al.*: Serum rheumatoid factor IgA, anti-citrullinated peptide antibodies with secretory components, and anti-carbamylated protein antibodies associate with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2022; 23(1): 1-8.
<https://doi.org/10.1186/s12891-021-04985-0>
 20. BOONSTRA M, BAKKER JA, GRUMMELS A *et al.*: Association of Anti-Topoisomerase I Antibodies of the IgM Isotype with Disease Progression in Anti-Topoisomerase I-Positive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2020; 72(11): 1897-904.
<https://doi.org/10.1002/art.41403>
 21. VAN LEEUWEN NM, WORTEL CM, FEHRES CM *et al.*: Association Between Centromere- and Topoisomerase-specific Immune Responses and the Degree of Microangiopathy in Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 2021; 48(3): 402-9.
<https://doi.org/10.3899/jrheum.191331>
 22. VAN LEEUWEN NM, BOONSTRA M, BAKKER JA *et al.*: Anticentromere Antibody Levels and Isotypes and the Development of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2021; 73(12): 2338-47.
<https://doi.org/10.1002/art.41814>
 23. YANG HT, HONG XP, GUO JW *et al.*: Clinical Significance of Different Profiles of anti-Ro Antibodies in Connective Tissue Diseases. *J Immunol Res* 2023; 2023: 1-11.
<https://doi.org/10.1155/2023/9195157>
 24. CHAN EKL: Anti-Ro52 Autoantibody Is Common in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases and Correlating with Worse Outcome when Associated with interstitial lung disease in Systemic Sclerosis and Autoimmune Myositis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2022; 63(2): 178-93.
<https://doi.org/10.1007/s12016-021-08911-z>
 25. WODKOWSKI M, HUDSON M, PROUDMAN S *et al.*: Monospecific anti-Ro52/TRIM21 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects: evidence of an association with interstitial lung disease and worse survival. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33 (Suppl. 91): S131-5.
 26. HUDSON M, POPE J, MAHLER M *et al.*: Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(2): R50.
<https://doi.org/10.1186/ar3763>
 27. ALONSO-LARRUGA A, BUSTABAD S, NAVARRO-GONZÁLEZ JA, RODRÍGUEZ-LOZANO B, FRANCO A, BARRIOS Y: Isolated Ro52 Antibodies as Immunological Marker of a Mild Phenotype of Undifferentiated Connective Tissue Diseases. *Int J Rheumatol* 2017; 2017: 1-6.
<https://doi.org/10.1155/2017/3076017>
 28. CHAN EKL, VON MÜHLEN CA, FRITZLER MJ *et al.*: The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021. The 6th Workshop and Current Perspectives. *J Appl Lab Med* 2022; 7(1): 322-30.
<https://doi.org/10.1093/jalm/jfab140>
 29. SOBANSKI V, GIOVANNELLI J, ALLANORE Y *et al.*: Phenotypes Determined by Cluster Analysis and Their Survival in the Prospective European Scleroderma Trials and Research Cohort of Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2019; 71(9): 1553-70.
<https://doi.org/10.1002/art.40906>
 30. HILDEBRANDT S, WEINER E, SENÉCAL JL *et al.*: The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1990; 33(5): 724-7.
<https://doi.org/10.1002/art.1780330515>
 31. VERHEIJEN R, DE JONG BA, VAN VENROOIJ WJ: A recombinant topoisomerase I ELISA: screening for IgG, IgM and IgA anti-topo I autoantibodies in human sera. *Clin Exp Immunol* 1992; 89(3): 456-60.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb06980.x>
 32. KUWANA M, KABURAKI J, MIMORI T, KAWAKAMI Y, TOJO T: Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(5): 1074.
[https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200005\)43:5<1074::AID-ANR18>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200005)43:5<1074::AID-ANR18>3.0.CO;2-E)
 33. HU PQ, FERTIG N, MEDSGER TA, WRIGHT TM: Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(5): 1363-73.
<https://doi.org/10.1002/art.10977>
 34. YI A, LEE CH, MOON HW, KIM H, HUR M, YUN YM: Evaluation of the LIA-ANA-Profile-17S for the detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Biochem* 2018; 55: 75-9.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.020>
 35. LANGGUTH DM, MORRIS S, CLIFFORD L *et al.*: Specific testing for "isolated" anti-52 kDa SSA/Ro antibodies during standard anti-extractable nuclear antigen testing is of limited clinical value. *J Clin Pathol* 2007; 60(6): 670-3.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2006.040360>

Publicació 3

Rheumatoid Factor IgG is associated with the presence of a UIP hrTC pattern in RA-ILD

Albert Pérez-Isidro, Juan Camilo Sarmiento-Monroy, Raul Castellanos-Moreira, Noemí de Moner, Judit Becerra, Anna Colmenero, Manuel Morales-Ruiz, Raimon Sanmartí, José Alfredo Gomez-Puerta, Mercè Tena, Maresa Grundhuber, Odette Viñas, Estíbaliz Ruiz-Ortiz

Manuscrit en preparació per a la seva publicació

