

TESIS DOCTORAL

NUEVO MECANISMO FISIOPATOLÓGICO INVOLUCRADO
EN LA PATOGENIA DE LAS ESPONDILOARTROPATÍAS
NEW PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISM INVOLVED IN
THE PATHOGENESIS OF SPONDYLOARTHROPATHIES

Tesis doctoral presentada por María Lourdes Ladehesa Pineda, Licenciada en Medicina, por la que opta al grado de Doctor en Medicina.

Directores: Alejandro Escudero Contreras

Yolanda Jiménez Gómez

Tutor: Eduardo Collantes Estévez

Programa de Doctorado: Biomedicina



UNIVERSIDAD
DE CÓRDOBA

Córdoba, Junio de 2021

TITULO: *Nuevo mecanismo fisiopatológico involucrado en la patogenia de las espondiloartropatías*

AUTOR: *María Lourdes Ladehesa Pineda*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: NUEVO MECANISMO FISIOPATOLÓGICO INVOLUCRADO EN LA PATOGENIA DE LAS ESPONDILOARTROPATÍAS.

DOCTORANDO/A: MARÍA LOURDES LADEHESA PINEDA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis que presenta la doctoranda Dña. M^a Lourdes Ladehesa Pineda es fruto de un trabajo original que se ha distinguido por un rigor y seriedad sobresalientes.

Se divide en dos estudios que, en suma, aportan nuevas evidencias que ayudan a aclarar el complejo entramado que caracteriza la fisiopatología de las espondiloartritis (EspA). El primero de ellos analiza el papel del proceso de la NETosis en la etiopatogenia de la espondiloartritis (EspA) axial radiográfica, el papel potencial de los productos derivados de la NETosis en circulación como biomarcadores diagnósticos y de actividad de la enfermedad y el papel beneficioso del tratamiento con anti-TNF- α sobre este proceso celular. El segundo evalúa la asociación presente entre el daño estructural y el riesgo CV estimado en los pacientes con EspA axial.

Los resultados obtenidos de este trabajo se han publicado en revistas científicas de reconocido prestigio internacional en el campo de la investigación biomédica: *Journal of Biomedical Science* (Cuartil 1); *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* (Cuartil 1).

La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de diversos proyectos de investigación financiados por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0314-2012; PI-0139-2017), la Fundación Española de Reumatología y la Fundación Andaluza de Reumatología.

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la capacitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 7 de junio de 2021

Firma del/de los director/es

ESCUDERO CONTRERAS
ALEJANDRO - 30791933Q

Firmado digitalmente por
ESCUDERO CONTRERAS
ALEJANDRO - 30791933Q
Fecha: 2021.06.02
14:18:22 +02'00'

JIMENEZ GOMEZ
YOLANDA -
44355417D

Digitally signed by JIMENEZ
GOMEZ YOLANDA - 44355417D
DN: CN = JIMENEZ GOMEZ
YOLANDA - 44355417D, SN =
JIMENEZ GOMEZ, G = YOLANDA,
C = ES
Date: 2021.06.02 14:41:43 +02'00'

Fdo.: Alejandro Escudero Contreras

Fdo.: Yolanda Jiménez Gómez

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas preliminares quiero hacer mención a todas las personas que han contribuido de diversas maneras a hacer realidad esta Tesis Doctoral.

Agradezco a todos mis compañeros, médicos especialistas y residentes, también a la Dra. Font Ugalde y a Ana Ruiz, de la Unidad de Gestión Clínica de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, el equipo al que orgullosamente pertenezco desde hace seis años, el haberme aportado tanto en diferentes áreas y acompañado en mis primeros pasos profesionales. Gracias a todos por ser fuente de conocimiento, ejemplo de un excelente comportamiento médico y humano, y apoyo en todas las ocasiones que lo han requerido. Sabed que siempre contaréis conmigo. Al Dr. Caracuel Ruiz, por su confianza en mí, y por transmitirme su amor por su profesión.

Al grupo GC-05 de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas-Crónicas del Aparato Locomotor y Tejido Conectivo del IMIBIC, liderado y compuesto por los mejores profesionales que un doctorando podría esperar que le acompañaran, en especial a la Dra. López Pedrera, la Dra. Barbarroja, el Dr. Arias de la Rosa, el Dr. Pérez Sánchez, y M^ª Carmen Ábalos. Vuestra calidad humana, experiencia y capacidad de trabajo me han deslumbrado en muchas ocasiones y considero una suerte que mi trabajo transcurra en colaboración con vosotros. No sólo he aprendido ciencia, sino que también me habéis hecho sentir acogida en mis visitas al laboratorio y al extranjero.

A mi directora, la Dra. Jiménez Gómez por su generosidad, por su capacidad de trabajo incansable incluso en circunstancias desfavorables, por dedicarme tantísimas horas de dudas y preocupaciones, por transmitirme su rigurosidad, perfeccionismo y exigencia a la hora de trabajar y sus ánimos y apoyo cuando todo parecía tan lejano y complicado. Gracias por hacer posible este trabajo.

A mi director, el Dr. Escudero Contreras, por haber sido guía y ejemplo de médico cercano, querido por sus pacientes y sus compañeros. He sido una privilegiada por haberte tenido como tutor durante mi residencia y como director en este período de doctorado. Gracias por tus enseñanzas, tu preocupación, tu disponibilidad y tu amistad.

A mi tutor y mentor, el Dr. Collantes Estévez. Gracias a tu compromiso, preocupación, perseverancia y afecto ha sido posible esta Tesis Doctoral. Gracias por contar conmigo, apoyarme y creer en mí desde el principio, incluso cuando yo no lo veía posible. Gracias por tu firmeza cuando es necesario, por tu sabiduría y ayuda siempre. Por permitirme ser un

componente de tu equipo y luchar por ello. Espero poder devolverte algún día parte de lo que me has aportado.

A la Dra. Castro Villegas. Le agradezco el haberme transmitido su amor por el cuidado de los pacientes reumatológicos, y haber sido mi ejemplo de fortaleza ante las adversidades. Su recuerdo, su cariño y enseñanzas me acompañarán siempre.

A mis padres, por haberme permitido crecer en un ambiente de amor, de responsabilidad y respeto por el trabajo. Por celebrar mis éxitos como si fueran suyos, por estar pendientes de cada necesidad, disponibles siempre y para todo, gracias por vuestra entrega sin límites. Por enseñarme la importancia y la necesidad de ser buena persona, del trabajo duro y la constancia, y ser el mejor ejemplo de ello. Por ser mi refugio. He tenido la suerte de crecer observando en casa el mejor modelo de buen médico que podría tener. Cuántas horas de ilusión, estudio y trabajo he pasado desde niña en el despacho de mi padre rodeada de huesos, articulaciones, libros de anatomía y demás. Gracias a mi padre por enseñarme a poner el bien de los demás por delante de todo.

A mis hermanos por su apoyo y por ser la mayor alegría de mi vida.

A toda mi familia.

A Nico, por su apoyo, paciencia e ilusión, y sobre todo, por ser mi hogar.

RESUMEN

Introducción. El término espondiloartritis (EspA) representa un grupo de enfermedades reumáticas heterogéneas de naturaleza inflamatoria crónica, que se encuentran interrelacionadas entre sí, y que comparten una serie de manifestaciones clínicas distintivas entre las que se encuentran la agregación familiar, la asociación con el antígeno leucocitario humano B27 (HLA-B27), la afectación predominante del esqueleto axial (columna vertebral y articulaciones sacroilíacas), un patrón típico de artritis periférica, entesitis, y manifestaciones extra-articulares como la uveítis, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras.

Los síntomas de la enfermedad suelen comenzar de forma insidiosa a una edad temprana, variando desde la infancia hasta los 45 años. Los pacientes suelen consultar por lumbalgia y rigidez como resultado de la inflamación de las articulaciones sacroilíacas y/o de la columna lumbar. Esta inflamación conduce a la formación de nuevo hueso y a un proceso de anquilosis del esqueleto axial que provoca una limitación funcional, en casos más graves discapacidad y a un deterioro en la calidad de vida de los pacientes cuando el daño radiográfico es avanzado.

La EspA axial (EspAax) es una enfermedad multifactorial cuya causa aún no es suficientemente conocida. En su etiopatogenia, sobre un individuo genéticamente predispuesto, participan e interaccionan factores medioambientales entre los que se encuentran el estrés biomecánico, las infecciones y la microbiota intestinal, así como los factores inmunológicos e inflamatorios. Todos estos factores tejen una compleja red de interrelaciones que provocan tanto la expresión fenotípica característica de la enfermedad como en sus comorbilidades, dentro de las cuales destaca el incremento del riesgo cardiovascular (CV).

Las células del sistema inmunológico son esenciales en la patogénesis de las EspAax, y aunque existe un considerable conjunto de evidencias sobre el papel central de los linfocitos T en el proceso patológico, el papel de los neutrófilos no se ha examinado a la misma extensión en esta enfermedad. Es bien conocido la función de los neutrófilos en la respuesta inmediata a las infecciones, empleando múltiples estrategias que incluyen la fagocitosis, la liberación de enzimas granulares tóxicas y de especies reactivas de oxígeno (ROS), o la generación de NETosis, un tipo de muerte celular específico de los neutrófilos para eliminar microorganismos nocivos. En el proceso de NETosis, los neutrófilos expulsan su contenido nuclear en forma de redes denominadas NETs (del inglés, *neutrophil extracellular traps*) en la cual capturan y destruyen a los microorganismos invasores. Estas redes están compuestas de cromatina (ADN de neutrófilos e histonas de alta afinidad) descondensada que está cubierta de péptidos antimicrobianos y enzimas generadoras de oxidantes (entre ellas, la elastasa de neutrófilos –NE-, la

mieloperoxidasa -MPO-, la NADPH oxidasa -NOX- y la óxido nítrico sintetasa -NOS-). La vía de transmisión de señales subyacente que conduce a la formación de las NETs implica la movilización de calcio, mediadores pro-inflamatorios, generación de ROS, delobulación nuclear por NE y MPO, y citrulinación de histonas por la peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4), todas ellas esenciales en la descondensación de la cromatina y en la extrusión del ADN. Si bien la observación inicial de la formación de las NETs mostró al proceso de NETosis como una estrategia esencial para inmovilizar y destruir a los microorganismos invasores, existen numerosas evidencias que sugieren que la formación aberrante de dichas redes también es fundamental en la etiología de diversas patologías, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. No obstante, nunca se ha evaluado la generación espontánea de NETosis y su papel en la fisiopatología de la EspAax.

En cuanto a las comorbilidades asociadas a la EspA, destaca el ya mencionado incremento del riesgo CV, siendo la enfermedad CV una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con EspAax radiográfica (EspAax-r). Además, existe un incremento en la prevalencia de aterosclerosis subclínica entre los pacientes con EspAax, siendo el aumento del grosor de la íntima media carotídea un hallazgo más frecuente que el aumento del número de placas carotídeas. La evidencia muestra que la aterosclerosis subclínica y el riesgo CV es menos frecuente entre los pacientes con actividad persistentemente baja de la enfermedad o en tratamiento con anti-TNF- α , sugiriendo el papel etiológico de la inflamación sistémica en esta patología. No obstante, hasta el momento, no se ha estudiado la relación entre el riesgo CV y la aterosclerosis con el daño estructural presente en la EspAax.

Por tanto, en el presente trabajo hemos pretendido arrojar nuevas evidencias que ayuden a aclarar el complejo entramado que caracteriza la fisiopatología de las espondiloartritis y para ello hemos realizado dos estudios con los siguientes objetivos: 1) Objetivo principal del primer estudio: evaluar el papel de la NETosis en la patogénesis de la EspAax-r y analizar los efectos beneficiosos de la terapia anti TNF- α sobre este proceso celular; 2) Objetivo principal del segundo estudio: evaluar la asociación entre los factores de riesgo de CV estimado y la aterosclerosis subclínica con el daño estructural radiográfico, independientemente de la edad, en un registro de pacientes con EspAax (CASTRO).

Pacientes, materiales y métodos. Para cumplir con los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral hemos desarrollado dos sistemas de reclutamiento de pacientes, de material utilizado y de métodos empleados. Ambos sistemas se han implementado secuencialmente intentando dar respuesta a las preguntas de investigación que motivan los trabajos conducentes a esta tesis doctoral:

Sistema 1. Estudio del papel de la NETosis en la patogénesis de la espondiloartritis axial radiográfica. Los pacientes fueron seleccionados de la consulta monográfica de EspA del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Para el estudio transversal, diseñado para evaluar la generación espontánea de NETosis y su asociación con parámetros clínicos inflamatorios, se incluyeron 30 pacientes con EspAax-r y 32 donantes sanos relacionados en sexo y edad mientras que, para el estudio longitudinal prospectivo, diseñado para evaluar el efecto de la terapia anti-TNF- α sobre el proceso de NETosis, se empleó una cohorte adicional de 15 pacientes con EspAax-r tratados con infliximab durante 6 meses. Todos los pacientes incluidos en el presente trabajo cumplían los criterios de clasificación para EspAax ASAS. Se cuantificó la formación de NETs, los mediadores de la cascada de transducción de señales necesaria para la inducción de la NETosis y los productos derivados de la NETosis extracelulares. Se diseñaron estudios *in vitro* para evaluar los efectos del infliximab en la generación de NETosis y el perfil inflamatorio desencadenado.

Sistema 2. Estudio de la evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural. Se realizó un estudio transversal que incluyó a 114 pacientes con EspAax del registro CASTRO (Córdoba Axial Spondyloarthritis Task force, Registry and Outcomes), y 132 controles sanos relacionados por edad y sexo. Se registró la actividad de la enfermedad y la presencia de factores de riesgo CV tradicionales. La presencia de placas ateroscleróticas y el grosor de la íntima media carotídea se evaluaron mediante ecografía carotídea y se calculó el índice SCORE de estimación del riesgo CV. El daño radiográfico se midió mediante mSASSS (del inglés, *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score*). La asociación entre el mSASSS y el SCORE se examinó mediante modelos lineales generalizados y se realizó un análisis de conglomerados ajustado por la edad para identificar diferentes fenotipos dependientes del riesgo CV subclínico.

Ambos estudios siguieron los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), el Convenio del Consejo Europeo sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina (1997), la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997), los requisitos establecidos en la legislación española en el área de investigación, de protección de datos de carácter personal y de bioética, en virtud de la Ley 14/2007 (Julio) sobre la Investigación Biomédica. Así mismo, se ajustaron a lo dispuesto en la Ley 31/1995 (de 8 de noviembre) sobre prevención en materia de salud y seguridad laboral, y los reales decretos relacionados con la exposición a agentes biológicos, y la investigación con células y tejidos humanos.

Resultados. En relación con el estudio de la NETosis, hemos hallado que, en comparación con los donantes sanos, los neutrófilos de los pacientes con EspAax-r exhiben un aumento en la

generación espontánea de NETs, una expresión elevada de componentes de señalización asociados a estas NETs, la translocación de la PAD4 al núcleo y un aumento de la histona H3 citrulinada. Además, los pacientes presentaron niveles circulantes alterados de productos de la NETosis extracelulares (ADN, nucleosomas y elastasa). Estudios adicionales revelaron que los productos derivados de la NETosis extracelulares podrían ser biomarcadores adecuados para distinguir a los pacientes con EspAax-r de los donantes sanos. Los estudios de correlación mostraron que existe una asociación entre los productos derivados de la NETosis extracelulares y los parámetros inflamatorios clínicos. Además, los nucleosomas demostraron potencial como biomarcador para discriminar a los pacientes según la actividad de la enfermedad. El tratamiento con infliximab promovió una reducción tanto de la generación de NETosis como de la actividad de la enfermedad en los pacientes con EspAax-r. Los estudios *in vitro* revelaron la importancia del tratamiento con infliximab en la reducción de la liberación de NETs y en la normalización de las actividades inflamatorias promovidas por la formación de NETs en las células mononucleares.

En relación con el estudio de la asociación del riesgo CV con el daño estructural en pacientes con EspAax, se observó un aumento de los factores de riesgo CV tradicionales, del SCORE y de la presencia de placas carotídeas en los pacientes con EspAax en comparación con los donantes sanos. En los pacientes con EspAax, los estudios de correlación mostraron que el SCORE y la presencia de placas carotídeas ateroscleróticas se correlacionaban significativamente con el daño estructural en términos de mSASSS total, mSASSS cervical y lumbar, sindesmofitos y puentes óseos. Un análisis de correlación en dos grupos de pacientes según la edad media (47 años), manifestó que la correlación entre el mSASSS total y el SCORE se mantenía en ambos grupos. Además, tras ajustar por la duración de la enfermedad, el hábito de fumar, el aumento de los niveles de PCR (al menos tres determinaciones en los últimos 5 años) y la ingesta de AINEs, el mSASSS total se asoció de forma independiente con el SCORE [coeficiente β 0,24; intervalo de confianza (IC) del 95%: 0,10-0,38]. De la misma forma, el mSASSS total también se asocia significativamente con la presencia de placas ateroscleróticas tras ajustar por la duración de la enfermedad, el estado de tabaquismo, la PCR y la ingesta de AINE (coeficiente β 1,05 (IC95% 1,01 - 1,12). El análisis de conglomerados o clústers que incluía como variables la presencia de placas carotídeas y los niveles de grosor de la íntima media carotídea derecha e izquierda distinguía dos fenotipos diferentes de pacientes según su prevalencia de factores de riesgo CV. Estos grupos se ajustaron por edad y utilizamos los datos de la ecografía carotídea para estratificar a los pacientes. Así, el clúster 1 se caracterizó por un aumento significativo del riesgo CV en comparación con el clúster 2, mostrando mayores tasas de hábito tabáquico, obesidad, índice aterogénico, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Asimismo, el clúster 1 tenía niveles

significativamente mayores de SCORE en comparación con los del clúster 2. Cabe destacar que el clúster 1, que no presentaba diferencias en la edad media con respecto al clúster 2, mostraba niveles significativamente aumentados de mSASSS total, mSASSS cervical, mSASSS lumbar y mayor presencia de puentes óseos.

Conclusiones:

- A. Los neutrófilos de pacientes con EspAax-r sufren generación espontánea de NETosis, indicativo de un potencial nuevo mecanismo involucrado en la patogénesis de la enfermedad.
- B. Los niveles circulantes de productos derivados de la NETosis extracelulares podrían ser biomarcadores útiles para la enfermedad y para discriminar a los pacientes según la actividad de la misma.
- C. Además de la actividad de la enfermedad, la terapia anti-TNF- α disminuye la generación de NETosis en los pacientes con EspAax-r.
- D. La inhibición de la NETosis mediante infliximab reduce la actividad inflamatoria de las células mononucleares de la sangre periférica, lo que sugiere un papel potencial de la generación de NET en la evaluación de la eficacia del tratamiento en pacientes con EspAax-r.
- E. Los pacientes con EspAax presentan un incrementado riesgo CV estimado.
- F. Los pacientes con EspAax-r con más daño estructural exhiben un mayor riesgo cardiovascular estimado, independientemente de la duración de la enfermedad, la edad y el hábito de fumar.
- G. La inflamación persistente en pacientes con EspAax se asocia con el elevado riesgo CV observado en esta enfermedad, lo que señala a la inflamación como la más importante conexión entre el daño radiográfico y el riesgo CV que la edad.

ABSTRACT

Background. The term spondyloarthritis (SpA) represents a group of heterogeneous rheumatic diseases of a chronic inflammatory nature, which are interrelated and share a number of distinctive clinical manifestations including familial aggregation, association with human leukocyte antigen B27 (HLA-B27), predominant involvement of the axial skeleton (spine and sacroiliac joints), a typical pattern of peripheral arthritis, enthesitis, and extra-articular manifestations such as uveitis, psoriasis and inflammatory bowel disease, among others. Symptoms of the disease usually begin insidiously at an early age, ranging from infancy to 45 years of age. Patients usually consult for low back pain and stiffness as a result of inflammation of the sacroiliac joints and/or the lumbar spine. This inflammation leads to new bone formation and a process of ankylosis of the axial skeleton resulting in functional limitation, in more severe cases disability and deterioration in patients' quality of life when radiographic damage is advanced. Axial SpA (AxSpA) is a multifactorial disease and its etiology is not yet sufficiently understood. Environmental factors, including biomechanical stress, infections and gut microbiota, as well as immunological and inflammatory factors, are involved and interact in its aetiopathogenesis in a genetically predisposed individual. All these factors weave a complex web of interrelationships that result in both the characteristic phenotypic expression of the disease and in its comorbidities, most notably the increased cardiovascular (CV) risk. Cells of the immune system are central to the pathogenesis of AxSpA, and while there is a considerable body of evidence for the central role of T lymphocytes in the pathological process, the role of neutrophils has not been examined to the same extent in this disease. The role of neutrophils in the immediate response to infection is well known, employing multiple strategies including phagocytosis, the release of toxic granular enzymes and reactive oxygen species (ROS), or the generation of NETosis, a type of cell death specific to neutrophils to eliminate harmful microorganisms. In the process of NETosis, neutrophils expel their nuclear contents in the form of networks called NETs (neutrophil extracellular traps) in which they capture and destroy invading microorganisms. These networks are composed of decondensed chromatin (neutrophil DNA and high-affinity histones) that is covered with antimicrobial peptides and oxidant-generating enzymes (including neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), NADPH oxidase (NOX) and nitric oxide synthase (NOS)). The underlying signalling pathway leading to NET formation involves calcium mobilization, pro-inflammatory mediators, ROS generation, nuclear delobulation by NE and MPO, and histone citrullination by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4), all of which are essential in chromatin decondensation and DNA extrusion. Whereas the initial observation of NET formation showed to this process as an essential strategy to

immobilize and kill invading microorganisms, extensive evidence suggest that aberrant NET formation is also central in a number of pathologies including rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE). However, to date no study has evaluated the NET generation and the regulation of their release in SpA patients. With regard to the comorbidities associated with SpAx, the aforementioned increase in CV risk stands out, with CV disease being one of the main causes of morbidity and mortality in patients with radiographic SpA (r-SpA). In addition, there is an increased prevalence of subclinical atherosclerosis among patients with axSpA, with increased carotid intima-media thickness being a more frequent finding than an increased prevalence of carotid plaques. Evidence shows that subclinical atherosclerosis and CV risk is less frequent among patients with persistently low disease activity or on anti-TNF- α therapy, suggesting an aetiological role of systemic inflammation in this pathology. However, so far, the relationship between CV risk and atherosclerosis and the structural damage present in axSpA has not been studied. Therefore, in the present work we have sought to provide new evidence to clarify the complex mechanism that characterises the pathophysiology of spondyloarthritis and to this end we have conducted two studies with the following objectives: 1) Main objective of the first study: To evaluate the role of NETosis in the pathogenesis of r-SpA and to analyse the beneficial effects of anti-TNF- α therapy on this cellular process; 2) Main objective of the second study: to evaluate the association between estimated CV risk and subclinical atherosclerosis with radiographic structural damage, independent of age, in a registry of patients with axSpA (CASTRO).

Patients, materials and methods. In order to meet the objectives proposed for this PhD thesis, we have developed two systems for patient recruitment, the material used and the methods employed. Both systems have been implemented sequentially in an attempt to answer the research questions that motivate the work leading to this thesis:

System 1. Study of the role of NETosis in the pathogenesis of r-SpA. Patients were selected from the monographic consult of SpA of the Rheumatology Department of the Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, Spain). For the cross-sectional study, designed to evaluate the spontaneous generation of NETosis and its association with clinical inflammatory parameters, 30 patients with r-SpA and 32 healthy donors age- and sex-matched were included while, for the prospective longitudinal study, designed to evaluate the effect of anti-TNF- α therapy on the NETosis process, an additional cohort of 15 patients with r-SpA treated with infliximab for 6 months was used. All patients included in the present study fulfilled the classification criteria for axSpA ASAS. The formation of NETs, the mediators of the signal transduction cascade required for NETosis induction, and extracellular NETosis-derived products

were quantified. In vitro studies were designed to assess the effects of infliximab on NETosis generation and the inflammatory profile triggered.

System 2. Study assessing the association of estimated CV risk and structural damage. A cross-sectional study was conducted involving 114 patients with axSpA from the CASTRO (Cordoba Axial Spondyloarthritis Task force, Registry and Outcomes) registry, and 132 age- and sex-matched healthy controls. Disease activity and the presence of traditional CV risk factors were recorded. The presence of atherosclerotic plaques and carotid intima-media thickness were assessed by carotid ultrasound and the SCORE CV risk estimation index was calculated. Radiographic damage was measured by the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS). The association between mSASSS and SCORE was examined using generalised linear models and an age-adjusted cluster analysis was performed to identify different phenotypes dependent on subclinical CV risk.

Both studies followed the principles established in the Declaration of Helsinki (1964), the European Council Convention on Human Rights and Biomedicine (1997), the UNESCO Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights (1997), the requirements established in the Spanish legislation in the area of research, personal data protection and bioethics, by virtue of Law 14/2007 (July) on Biomedical Research. They also complied with the provisions of Law 31/1995 (8 November) on occupational health and safety prevention, and the royal decrees related to exposure to biological agents, and research with human cells and tissues.

Results. In relation to the NETosis study, we found that, compared to healthy donors, neutrophils from r-SpA patients exhibit increased spontaneous NET generation, elevated expression of NET-associated signalling components, translocation of PAD4 to the nucleus and increased citrullinated histone H3. In addition, patients had altered circulating levels of extracellular NETosis products (DNA, nucleosomes and elastase). Further studies revealed that extracellular NETosis-derived products could be suitable biomarkers to distinguish r-SpA patients from healthy donors. Correlation studies showed that there is an association between extracellular NETosis-derived products and clinical inflammatory parameters. In addition, nucleosomes demonstrated potential as biomarker to discriminate patients according to disease activity. Infliximab treatment promoted a reduction in both NETosis generation and disease activity in patients with r-SpA. In vitro studies revealed the importance of infliximab treatment in reducing NETs release and normalising inflammatory activities promoted by NET formation in mononuclear cells.

In relation to the study of the association of CV risk with structural damage in patients with axSpA, an increase in traditional CV risk factors, SCORE and the presence of carotid plaques was

observed in axSpA patients compared to healthy donors. In patients with axSpA, correlation studies showed that SCORE and the presence of atherosclerotic carotid plaques correlated significantly with structural damage in terms of total mSASSS, cervical and lumbar mSASSS, syndesmophytes and bone bridges. A correlation analysis in two groups of patients according to mean age (47 years) showed that the correlation between total mSASSS and SCORE was maintained in both groups. Furthermore, after adjusting for disease duration, smoking, increased CRP levels (at least three measurements in the last 5 years) and NSAID intake, total mSASSS was independently associated with SCORE [coefficient β 0.24, 95% confidence interval (CI) 0.10-0.38]. Similarly, total mSASSS was also significantly associated with the presence of atherosclerotic plaques after adjusting for disease duration, smoking status, CRP and NSAID intake (coefficient β 1.05 (95% CI 1.01-1.12). Cluster analysis including as variables the presence of carotid plaques and levels of right and left carotid intima-media thickness distinguished two different phenotypes of patients according to their prevalence of CV risk factors. These clusters were adjusted for age and carotid ultrasound data was used to stratify patients. Thus, cluster 1 was characterised by significantly increased CV risk compared to cluster 2, showing higher rates of smoking, obesity, atherogenic index, insulin resistance and type 2 diabetes. Also, cluster 1 had significantly higher SCORE levels compared to cluster 2. Notably, cluster 1, which had no difference in mean age compared to cluster 2, showed significantly increased levels of total mSASSS, cervical mSASSS, lumbar mSASSS and increased presence of bone bridges.

Conclusions:

- A. Neutrophils from r-axSpA patients spontaneously undergo NETosis, underlying a new potential mechanism in the disease pathogenesis.
- B. Circulating levels of cell-free NETosis-derived products could be useful biomarkers for disease and for discriminating patients according to disease activity.
- C. In addition to disease activity, NETosis is down-regulated by anti-TNF- α therapy in r-axSpA patients.
- D. Inhibition of NETosis by infliximab reduces inflammatory activity of peripheral blood mononuclear cells, suggesting a potential role of NET generation for the assessment of treatment effectiveness in r-axSpA patients.
- E. Patients with axSpA present an increased estimated CV risk.
- F. AxSpA patients with more structural damage display increased predicted cardiovascular risk, independently of disease duration, age, and smoking habit.

- G. Persistent inflammation in patients with axSpA is associated with the increased CV risk observed in this disease, pointing to inflammation as a more important link between the radiographic damage and CV risk than age.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Espondiloartritis axial. Concepto	5
1.2.	Clasificación y diagnóstico.....	6
1.2.1.	Criterios de clasificación de las espondiloartropatías.....	7
1.2.2.	Desarrollo de los criterios ASAS	8
1.3.	Manifestaciones	9
1.3.1.	Síntomas constitucionales.....	9
1.3.2.	Síndrome axial.....	9
1.3.3.	Síndrome periférico.....	10
1.3.4.	Síndrome entesítico	11
1.3.5.	Manifestaciones extra-articulares.....	11
1.4.	Epidemiología.....	12
1.4.1.	Factores de riesgo	13
1.4.2.	Progresión de la enfermedad.....	15
1.4.3.	Mortalidad.....	15
1.5.	Etiopatogenia	16
1.5.1.	Genética de la EspAax	16
1.5.2.	Factores medioambientales	19
1.5.3.	Factores inmunológicos e inflamatorios	20
1.5.4.	Fisiopatología del hueso.....	24
1.6.	Evaluación clínica de la enfermedad.....	25
1.6.1.	Biomarcadores	25
1.6.2.	Evaluación de la actividad de la enfermedad en la EspAax	27
1.6.3.	Evaluación de entesitis y afectación de las articulaciones periféricas.....	29
1.6.4.	Evaluación de la función física	30
1.6.5.	Evaluación de la movilidad espinal.....	30
1.6.6.	Estado funcional y de salud, incluyendo la calidad de vida	31
1.7.	Imagen en EspAax	31
1.7.1.	Radiología simple	31
1.7.2.	Resonancia magnética.....	32
1.8.	Comorbilidades	33
1.8.1.	ECV	33

1.8.2.	Enfermedad pulmonar	39
1.8.3.	Enfermedad renal.....	40
1.8.4.	Enfermedades genitourinarias y gestación	40
1.8.5.	Osteoporosis y fracturas	41
1.8.6.	Enfermedades neurológicas.....	42
1.8.7.	Otras condiciones.....	42
1.9.	Tratamiento.....	43
1.9.1.	Tratamiento no farmacológico.....	43
1.9.2.	Tratamiento farmacológico no biológico	43
1.9.3.	Tratamiento farmacológico biológico	46
2.	JUSTIFICACIÓN.....	49
3.	HIPÓTESIS.....	51
4.	OBJETIVOS.....	53
5.	PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
5.1.	Sistema 1: Estudio del papel de la NETosis en la patogénesis de la espondiloartritis axial radiográfica	56
5.2.	Sistema 2: Estudio de la evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural.....	66
6.	RESULTADOS	71
6.1.	Estudio de la NETosis.....	71
6.1.1.	Población de estudio	71
6.1.2.	Incremento de la generación de NETosis en los pacientes con EspAax-r	72
6.1.3.	Expresión aumentada de componentes de señalización asociados a las NETs, translocación de PAD4 al núcleo, y el aumento de citrulinación de la histona H3 en los neutrófilos de pacientes con EspAax-r.....	73
6.1.4.	Los pacientes con EspAax-r muestran niveles circulatorios alterados de productos derivados de la NETosis	74
6.1.5.	Los niveles circulantes de marcadores de NETosis extracelulares se asocian a parámetros inflamatorios clínicos	77
6.1.6.	Utilidad de los nucleosomas extracelulares en circulación como biomarcadores para la actividad de la enfermedad en los pacientes con EspAax-r.....	78
6.1.7.	La terapia anti-TNF- α reduce la generación de NETosis en pacientes con EspAax-r	78
6.1.8.	La inhibición de la liberación de NETs por el tratamiento <i>in vitro</i> con infliximab modula el perfil inflamatorio en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	81

6.2. Estudio de la evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural.....	82
6.2.1. Riesgo cardiovascular en pacientes con EspAax	82
6.2.2. Asociación entre el riesgo CV estimado y el daño estructural	84
6.2.3. Asociación entre el riesgo CV medido por el SCORE y la ecografía carotídea en pacientes con EspAax.....	87
6.2.4. Análisis de clusters	88
7. DISCUSIÓN.....	92
7.1. Papel de la NETosis en la patogénesis de la EspAax-r.....	92
7.2. Evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural	96
8. CONCLUSIONES	104
9. CONCLUSIONS	106
10. REFERENCIAS.....	108
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	146
PUBLICACIONES DERIVADAS DEL DESARROLLO DE LA TESIS	150

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Espondiloartritis axial. Concepto

El término espondiloartritis (EspA) representa un grupo de enfermedades reumáticas heterogéneas de naturaleza inflamatoria crónica, que se encuentran interrelacionadas entre sí, y que comparten una serie de manifestaciones clínicas distintivas (1). Entre ellas se encuentra la agregación familiar, la asociación con el antígeno leucocitario humano B27 (HLA-B27), la afectación predominante del esqueleto axial (columna vertebral y articulaciones sacroilíacas), un patrón típico de artritis periférica, entesitis (tanto en articulaciones periféricas como en la columna vertebral), y manifestaciones extra-articulares como la uveítis, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras.

El concepto de EspA se propuso en 1974, cuando Moll *et al.*, (2), plantearon agrupar algunas afecciones que compartían ciertas características clínicas, serológicas y radiográficas bajo el término de “espondiloartritis seronegativas”. Una de las características más importantes y específicas de las EspA es la inflamación de unas estructuras del organismo llamadas entesis - zonas de inserción de tendones, ligamentos y cápsula articular con el hueso-, inflamación que se encuentra asociada con la osteítis, y en menor extensión, con la sinovitis. La inflamación aguda de las entesis se denomina entesitis y afecta tanto a las articulaciones periféricas como a la columna vertebral, mientras que la crónica produce fibrosis, osificación, neoformación ósea y en última instancia anquilosis. La entesis es en la actualidad más ampliamente denominada como “órgano entesítico” e incluye, además de lo citado anteriormente, el fibrocartilago adyacente, la bursa, el tejido adiposo, la fascia profunda y el hueso trabecular, ya que todos ellos actúan conjuntamente para desempeñar una tarea común, el anclaje y la resistencia al estrés físico (3). Dadas las numerosas localizaciones de los órganos entesíticos, existe diversidad de manifestaciones clínicas resultantes en estos pacientes, las cuales varían desde la entesitis a la anquilosis completa, que conduce a una disminución en la calidad de vida de estos pacientes.

Otro concepto de gran interés en las EspA es su asociación con el gen HLA-B27. Este gen, localizado en el cromosoma 6, forma unas moléculas en la superficie de células presentadoras de antígenos del organismo cuya función es la de reconocer fragmentos de bacterias y virus, favoreciendo así la destrucción de la célula infectada.

Las manifestaciones clínicas de las EspA suelen evolucionar de forma lenta y, aunque el paciente presenta episodios con exacerbaciones de la enfermedad entremezclados con

periodos libres de síntomas, son pocos los que evolucionan a una forma invalidante, permitiéndole tener una vida normal.

1.2. Clasificación y diagnóstico

Los criterios de clasificación, así como los diagnósticos desempeñan papeles fundamentales en la reumatología clínica, pero no son siempre bien aplicados, ya que no son intercambiables y su mal uso puede generar confusión. Esta confusión puede basarse en el hecho de que los criterios de clasificación y diagnósticos utilizan los mismos datos clínicos, de laboratorio y de imagen, aunque se incorporen de forma diferente.

La clasificación consiste en aplicar características clínicas comunes para agrupar pacientes homogéneos con el objetivo de incorporarlos a ensayos clínicos o estudios epidemiológicos, mientras que los criterios diagnósticos tienen por objeto ayudar en el proceso diagnóstico de un paciente de forma individual.

En las EspA, las diversas expresiones fenotípicas conforman las diferentes entidades, que se denominan Artritis Psoriásica (APs), EspA asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Artritis Reactiva, EspA de inicio juvenil, EspA indiferenciada y Espondilitis Anquilosante (EA), que representa el prototipo clásico de las EspA. Sin embargo, este concepto de EspA se encuentra en evolución y, actualmente, el grupo ASAS (Assessment of Spondyloarthritis International Society) ha propuesto una nueva clasificación de los pacientes con EspA, basándose en los síntomas predominantes (4):

- Una forma en la que predomina la afectación del esqueleto axial, incluyendo la columna y las articulaciones sacroilíacas, denominada EspA axial (EspAax), cuyo prototipo es la que tradicionalmente se ha conocido como Espondilitis Anquilosante (EA) o EspAax radiográfica (EspAax-r). El término EA se reserva para una forma más restrictiva que requiere evidencia de sacroilitis radiográfica para su diagnóstico.
- Una forma con afectación predominantemente periférica, denominada EspA periférica (EspAp) que incluye la artritis psoriásica (APs), las artritis relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, las artritis reactivas, y las formas indiferenciadas de EspA.

Esta clasificación proporciona una información más relevante para la práctica clínica que la clasificación tradicional basada en las diferentes entidades, ya que la eficacia del tratamiento en las manifestaciones axiales y periféricas ha demostrado ser diferente, independientemente de la entidad nosológica.

En cuanto al diagnóstico, hasta la fecha, no existen criterios diagnósticos para ninguna de las entidades que conforman el espectro de las EspA.

1.2.1. Criterios de clasificación de las espondiloartropatías

Los primeros criterios de clasificación estandarizados e internacionales en pacientes con EspAax-r se establecieron en Roma en 1961, los cuales especificaban que el diagnóstico se podía establecer bien en presencia de sacroilitis bilateral más uno de cinco criterios clínicos (dolor lumbar que se alivia con el ejercicio y que no mejora con el reposo de más de 3 meses de duración, dolor y rigidez torácica, limitación a la expansión torácica, uveítis pasada o presente, limitación a la movilidad de la columna lumbar) o si cuatro de estos criterios clínicos estaban presentes (5). En 1966, tras la exclusión del dolor torácico y la uveítis, emergieron los criterios de Nueva York, los cuales se modificaron en 1984 (criterios de Nueva York modificados -NYM-), con el reconocimiento de la relevancia del carácter inflamatorio del dolor lumbar (6). De acuerdo con estos criterios, un paciente se podría clasificar con EspAax-r si presenta al menos uno de tres criterios clínicos (dolor lumbar inflamatorio -DLI-, limitación en la movilidad de la columna lumbar, o limitación en la expansión torácica), más un criterio radiológico (sacroilitis bilateral radiográfica de grado 2 o sacroilitis unilateral radiográfica grado 3-4). Para cumplir con estos criterios, los pacientes necesitaban presentar un grado avanzado de daño radiográfico en las articulaciones sacroilíacas, por tanto, los criterios de NYM no son adecuados para clasificar a los pacientes en fases tempranas de la enfermedad. Además, estos criterios incluyen únicamente a pacientes con síntomas axiales y, además, los signos radiológicos en las EspAax pueden ser de aparición tardía, por lo que estos criterios no son útiles en fases iniciales de la enfermedad, ni en forma indiferenciadas. Con esta base, se introdujeron otros dos grupos de criterios de clasificación que permitían incluir al subgrupo de pacientes con EspA indiferenciadas y aquellos que se encuentran en las fases iniciales de la enfermedad, los criterios de Amor (7) y los criterios de la “*European Spondyloarthropathy Study Group*” (ESSG) (8), que han sido muy útiles gracias a sus buenas cualidades en términos de sensibilidad (Amor 90.8% y ESSG 83.5%) y especificidad (Amor 96.2% y ESSG 95.2%) (9). Los criterios de Amor se publicaron en 1990 y permiten clasificar a todas las EspA. Consisten en una lista de signos clínicos, genéticos y radiográficos sin requerir ningún criterio de entrada. Cada ítem (12 en total) se valora con 1, 2 ó 3, y una puntuación total de 6 permite clasificar a un paciente con EspA. Los criterios ESSG, también diseñados para todo el conjunto de EspA, se propusieron en 1991 y se validaron en España en 1995 (10). En estos, el criterio de entrada se basaba en los dos síntomas predominantes de las EspA: la presencia de DLI y (oligo)artritis asimétrica. Si el paciente cumple, al menos, un criterio de entrada (y otro adicional (historia familiar de EA, uveítis, artritis reactiva, enfermedad inflamatoria intestinal,

psoriasis, dolor alternante de nalgas, dolor en tendón de Aquiles o fascitis plantar, diarrea en el mes previo al inicio de la artritis, uretritis o cervicitis no gonocócica en el mes previo al inicio de la artritis y sacroilitis radiográfica según criterios de NYM) se acepta su clasificación como EspA.

1.2.2. Desarrollo de los criterios ASAS

Dada la introducción de la resonancia magnética como herramienta para evaluar la presencia de cambios inflamatorios precoces en las articulaciones sacroilíacas (RM-SI) y la entrada en juego de nuevas terapias efectivas en el tratamiento de la EspAax-r se desarrollaron los nuevos criterios de clasificación, que permiten reconocer a pacientes en estadios más precoces. Estos criterios fueron desarrollados por el grupo ASAS, publicándose en 2009 para su forma clínica predominantemente axial (EspAax) (4), y en 2011 para la periférica (EspAp) (11). En el subtipo axial, una dolencia puede clasificarse como EspAax en presencia de dolor lumbar de 3 meses o más de evolución y edad de inicio menor de 45 años, si presentan o bien sacroilitis en imagen (radiográfica según criterios de NYM, o inflamación activa en RM-SI) y al menos una característica de las siguientes: DLI, artritis, entesitis del talón, uveítis, dactilitis, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, buena respuesta a tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos –AINEs-, historia familiar de EspA, HLA-B27 o proteína C Reactiva –PCR- elevada, o bien si presenta HLA-B27 y al menos dos de las características anteriores. Para el subtipo periférico, es necesario que el paciente presente artritis o entesitis o dactilitis, y al menos una característica de las siguientes: sacroilitis previa, uveítis, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, infección previa, HLA-B27, o al menos dos características de las siguientes: artritis, entesitis, dactilitis, DLI alguna vez o historia familiar de EspA. Estos criterios nos permiten un rendimiento mejor que los criterios de Amor y los del ESSG, que fueron realizados en la época anterior al desarrollo de la RM-SI. En concreto, los criterios ASAS para pacientes con síntomas axiales presentan una sensibilidad del 82.9% y una especificidad del 84.4%, mientras que aquellos para formas predominantemente periféricas presentan una sensibilidad y especificidad del 78.8% y 82.2%, respectivamente.

Estos criterios han favorecido el acuñamiento del término EspAax-nr, que es aquella que caracteriza a los pacientes que presentan los rasgos clínicos típicos de la EspAax-r pero no llegan a desarrollar sacroilitis radiográfica, lo cual representa un paso adelante en el objetivo de una mejor y temprana identificación de los pacientes con EspAax. Probablemente, la contribución más importante de este concepto es llevarnos a confirmar finalmente (o no) que un enfoque terapéutico temprano en estos pacientes cambia el curso de la enfermedad o incluso induce una remisión permanente (12).

Una década después, se ha erigido la cuestión de si los criterios ASAS deberían ser revisados dado que podrían favorecer un “sobrediagnóstico” por parte de los clínicos que emplean estos criterios como diagnósticos en lugar de clasificatorios. También se ha puesto en duda la especificidad del brazo clínico, y se ha propuesto que no todos los rasgos clínicos de la EspAax deberían tener el mismo peso. Además, la actual definición de sacroilitis por RM-SI (13) está resultando otro objeto de debate estos días. Este contexto ha provocado que la “*Spondyloarthritis Research and Treatment Network*” (SPARTAN) de Norteamérica y el grupo ASAS se hayan unido para la puesta en marcha del proyecto “*Classification of Axial Spondyloarthritis Inception Cohort*” (CLASSIC) cuyo objetivo es validar a nivel internacional los criterios ASAS para EspAax con una sensibilidad y especificidad de al menos el 75% y 90%, respectivamente.

1.3. Manifestaciones

Los síntomas de la enfermedad suelen comenzar de forma insidiosa a una edad temprana (adolescencia tardía o inicio de la juventud), variando desde la infancia hasta los 45 años de edad, con una edad media de 23 años. Rara vez los síntomas comienzan después de los 45 años. Los pacientes suelen consultar por lumbalgia y rigidez como resultado de la inflamación de las SI y/o columna lumbar. Otros pacientes pueden debutar con síntomas derivados de entesitis, sinovitis, y/o afectación de órganos extra-articulares como el ojo, la piel o el intestino (14) (15).

1.3.1. Síntomas constitucionales

Incluyen malestar general, anorexia, pérdida de peso, febrícula, y se observan con mayor frecuencia en pacientes con edad de inicio más temprana, sobre todo en la infancia, así como en países en vías de desarrollo. Además, la fatiga puede ser un síntoma común, que puede llegar a ser severa y normalmente es debida a la actividad de la enfermedad y/o al sueño inadecuado e interrumpido como resultado del dolor lumbar y la rigidez.

1.3.2. Síndrome axial

El dolor lumbar es usualmente insidioso al inicio, de carácter sordo, difícil de localizar, e inicialmente se siente en la región glútea profunda. Puede ser intermitente y puede afectar a un único lado o alternar de un lado al otro en los estadios más iniciales, antes de hacerse bilateral y/o persistente. Este dolor alternante de nalgas, cuando está presente, es una pista útil en la enfermedad inicial y refleja la naturaleza fluctuante de la inflamación de las articulaciones sacroilíacas en la EspAax. Los síntomas gradualmente se extienden hasta afectar a la columna lumbar. El dolor y la rigidez en la columna torácica y cervical suelen desarrollarse

posteriormente, aunque ocasionalmente pueden ser el motivo inicial de consulta, sobre todo en mujeres. El dolor y la rigidez en la musculatura paraespinal pueden llegar a ser, asimismo, un síntoma prominente.

Este DLI ha sido definido por los criterios ASAS como dolor lumbar crónico (de duración superior a 3 meses) que presenta además 4 de los siguientes 5 rasgos: inicio antes de los 40 años, inicio insidioso, mejoría con la actividad física, ausencia de mejoría con el reposo y dolor nocturno que mejora al levantarse de la cama y moverse o realizar ejercicio (16).

El dolor torácico que empeora con la tos, estornudos o inspiración profunda puede ser en ocasiones el motivo inicial de consulta. Se debe diferenciar del dolor pleurítico y pericárdico, y resulta de la inflamación de las articulaciones facetarias, costovertebrales y costotransversas, que puede disminuir con el tiempo la expansión torácica. La pared anterior de la caja torácica puede ser dolorosa por entesitis de las uniones esternoclaviculares, manubrioesternales y costoesternales.

En las formas graves de EspA, a nivel raquídeo, pueden aparecer osificaciones de las fibras externas del anillo fibroso formando puentes óseos intervertebrales denominados sindesmofitos, que cuando se extienden a lo largo de la columna pueden condicionar una postura anormal de la columna producida por la pérdida de la lordosis lumbar y la aparición de una hiper cifosis torácica. En casos severos, si la anquilosis afecta a la región cervical, el cuello queda inclinado hacia delante sin posibilidad de realizar los movimientos de flexo-extensión y rotación.

1.3.3. Síndrome periférico

La presencia de artritis periférica en las EspA es habitual, pudiendo ser la manifestación inicial y el primer motivo de consulta. La afectación, mono u oligoarticular, asimétrica y no erosiva, predomina en miembros inferiores (caderas, rodillas, tarsos y metatarsianos), hombros y, de forma excepcional, afecta articulaciones de las manos sin producir deformidades (17).

La cadera se ve implicada en un 25% de los pacientes con EspA, y se presenta por lo general en pacientes con formas más graves de enfermedad, lo que se asocia con un deterioro funcional. La afectación de la cadera es típicamente bilateral y progresiva, llevando a una disminución concéntrica del espacio articular (18).

La afectación del hombro en los pacientes con EspA es de inicio más tardío y se caracteriza por la tendinitis del manguito y la entesitis, mientras que la afectación primaria de la articulación glenohumeral es poco frecuente (18).

La dactilitis, como expresión de la inflamación de los tendones, puede ocurrir en todas las formas de EspA, aunque es más frecuente en la APs (19).

1.3.4. Síndrome entesítico

Como se indicó previamente, la entesitis es el hallazgo clínico más característico de las EspA. La entesitis periférica es más frecuente en los puntos sometidos a mayor estrés físico y se manifiesta, habitualmente, con dolor localizado, rigidez, y más sensibilidad con o sin inflamación (20). La más frecuente es la del tendón de Aquiles, aunque también se puede dar en las crestas iliacas, tuberosidades isquiáticas, trocánteres mayores, bursa anserina, tendón rotuliano, tendón del cuádriceps, en las articulaciones costocondrales, costoesternales, manubrioesternales y esternoclaviculares. La entesitis axial, por su parte, es la que se manifiesta cuando se produce una inflamación en los puntos de unión de los ligamentos vertebrales a las vértebras y, por tanto, puede también causar dolor y sensibilidad en la columna a nivel de las apófisis espinosas vertebrales.

Los pacientes con EspAax de inicio juvenil o las formas de EspAax con psoriasis, afectación intestinal o artritis reactiva concomitante tienden a tener mayor incidencia de artritis periférica, entesitis, tendinitis, bursitis y tenosinovitis (21).

1.3.5. Manifestaciones extra-articulares

Son aquellos signos y síntomas que, originándose en órganos y tejidos diferentes al aparato locomotor, se encuentran relacionados etiopatogénicamente con las EspA.

i. Manifestaciones oculares: Uveítis

La uveítis es la manifestación extra-articular más frecuente en la EspA y se define como la inflamación de la úvea, que se corresponde con la capa media del ojo y que se encuentra compuesta por el iris y el cuerpo ciliar, que conforman la úvea anterior, y la coroides que conforma la úvea posterior. La uveítis anterior aguda es la forma más frecuente en la EspAax, apareciendo en el 81-85% de los pacientes (22), y hasta en un 50% de las ocasiones se asocia al HLA-B27 (23). Se manifiesta clínicamente como ojo rojo doloroso de inicio súbito, acompañado de fotofobia y miosis, y entre sus complicaciones se encuentran la formación posterior de hipopion y sinequias. Su tratamiento incluye los glucocorticoides y midriáticos tópicos, y en casos refractarios glucocorticoides intraoculares. En casos recurrentes, es necesario añadir inmunomoduladores convencionales y/o agentes biológicos.

La uveítis anterior aguda puede constituir la primera manifestación de la EspA. En un estudio realizado por nuestro equipo de investigación se demostró que los pacientes que presentaban

un primer episodio de uveítis anterior aguda antes o concomitantemente con el inicio de los síntomas reumáticos exhibían formas menos graves de enfermedad (mejor capacidad funcional y menos daño estructural) y un menor retraso en el diagnóstico; sin embargo, el momento de inicio de la uveítis anterior aguda no influía en los tratamientos recibidos (24).

ii. Manifestaciones intestinales: Enfermedad inflamatoria intestinal

La relación entre afección intestinal y manifestaciones reumáticas se conoce desde hace décadas, y surgió por la observación clínica de afecciones intestinales agudas y crónicas en pacientes con diferentes formas clínicas de artritis, así como como por la afectación articular -axial y periférica- en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad que engloba tres entidades: la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la colitis inespecífica. La conexión más notable entre ambos trastornos se observa con las EspA, y dentro de éstas con la EspAax-r, donde se ha hallado que el 5-10% de los pacientes presentan enfermedad inflamatoria intestinal, aunque se ha detectado inflamación intestinal subclínica en el 25-49% y lesiones histológicas del intestino en el 50-60% de los mismos (25).

Se ha postulado que existe una relación fisiopatológica entre la enfermedad inflamatoria intestinal y la EspAax, y estudios recientes han mostrado que existe un microbioma diferente en los pacientes con EspAax cuando se compara con el de individuos sanos, existiendo un incremento de la presencia de algunas especies bacterianas -Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y Prevotellaceae, en los pacientes con EspAax (26). Por tanto, se postula que esta alteración en el microbioma podría ser el nexo de unión entre ambas patologías.

iii. Manifestaciones cutáneas: Psoriasis

La psoriasis se caracteriza por una proliferación de queratinocitos, lo que resulta en la aparición de placas cutáneas eritematosas y pruriginosas. Esta enfermedad presenta una prevalencia del 2-3% en la población mundial, mientras que este porcentaje puede llegar a alcanzar un 30% en pacientes que desarrollan artritis psoriásica, una enfermedad que se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones periféricas, las entesis y la columna. En el contexto de las EspAax, la incidencia de psoriasis es de aproximadamente un 5%-10%, mostrando, además, los pacientes con EspAax y psoriasis más afectación articular periférica que aquellos sin psoriasis (27).

1.4. Epidemiología.

La prevalencia de la EspA oscila entre el 0.1% y el 1.4% a nivel mundial, variando su prevalencia en función de la localización geográfica, etnia y, sobre todo, de la frecuencia del

antígeno HLA-B27 en población general (28). Dentro de las EspA, la prevalencia media de las EspAax se estima en 0.24% (media ponderada: 0.18%) en Europa, 0.17% (media ponderada del 0.18%) dentro de Asia, y 0.10% (media ponderada 0.12%) dentro de América Latina (29).

1.4.1. Factores de riesgo

i. Edad y sexo

Tradicionalmente, la EspAax-r se ha considerado una enfermedad que afecta a jóvenes, tanto hombre como mujeres, con un rango de inicio de síntomas entre los 12 y los 45 años. No obstante, datos recientes de diversas cohortes, entre ellas las de los Países Bajos, Bélgica y Francia (OASIS) (30), Alemania (GESPIC), Suiza (SCQM), España (REGISPONSER) (31), Iberoamérica (RESPONDIA), y Turquía (TRASD-IP), han estimado la edad media al comienzo entre 23 y 31 años de edad, es decir, se ha producido un aumento de la edad de inicio, especialmente en los países desarrollados. Así mismo, también se ha observado una disminución progresiva del predominio masculino en la enfermedad. Así, por ejemplo, la proporción hombres: mujeres de 9:1 reportada en la década de 1940 ha disminuido a 2-3:1 en las cohortes recientes. Además, a diferencia de la EspAax-r, los pacientes con EspAax-nr apenas muestran diferencias en su prevalencia entre hombres y mujeres. Los datos de los registros nacionales relativos a ambos subconjuntos de EspAax (EspAax-r y EspAax-nr), sugieren que los pacientes con EspAax-nr son ligeramente mayores y más frecuentemente mujeres (32).

ii. HLA-B27 e historia familiar

Numerosos estudios han descrito una alta prevalencia del antígeno HLA-B27 entre los pacientes con EspAax y, sobre todo, en aquellos que presentan formas radiográficas (33) (34) (35) (36). En efecto, el HLA-B27 se relaciona con una aparición más temprana de la afectación axial y con una mayor severidad y persistencia de las lesiones inflamatorias de la columna lumbar y articulaciones sacroilíacas (37). Presentar el antígeno HLA-B27 supone una probabilidad del 1-2% de padecer EspAax-r, porcentaje que se incrementa hasta el 10-20% si, además de ser positivo para HLA-B27, existe un familiar de primer grado que ya padece la enfermedad. Un estudio reciente de Islandia cuantificó el riesgo de desarrollar EspAax-r entre los familiares de primer a cuarto grado de los casos de EspAax-r y encontró un mayor riesgo de extenderse a los familiares de primer, segundo y tercer grado, pero no más allá. Los riesgos relativos estimados para el primer, segundo y tercer grado fueron 75.5, 20.2 y 3.5, respectivamente (todos los valores de $p < 0.0001$) (38).

iii. Infecciones

Se ha observado que las infecciones producidas durante la infancia pueden influir en el riesgo de desarrollar EspAax-r. Específicamente, se han demostrado mayores tasas de hospitalización durante la infancia por infecciones de las vías respiratorias, en particular de amigdalitis, en pacientes con EspAax-r en comparación con controles sanos relacionados por sexo, edad y país de procedencia (39). Así mismo, la artritis reactiva, que a veces puede conducir al desarrollo de EspAax-r, suele ser desencadenada por infecciones entéricas o urogenitales, que incluyen pero no se limitan a *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*.

iv. Estrés biomecánico

El estrés biomecánico juega un papel esencial en las EspA y se ha demostrado que la tensión mecánica puede desencadenar inflamación intestinal y conducir a la formación de nuevo hueso (40). Además, el mismo estudio mostró que la respuesta a la tensión mecánica en la entesis no se limita al punto de unión, sino que también implica a los tejidos inmediatamente adyacentes al órgano de la entesis, incluyendo el hueso, la fascia extra-entésica, el complejo sinovio-entésico y el hueso, favoreciendo, así, el desarrollo de la anquilosis. El nexo de unión entre el sistema inmunitario y la respuesta al estrés biomecánico incluye varias vías metabólicas/de citoquinas, las cuales comprenden factores transcripcionales, proteínas quinasas activadas por mitógenos y otras vías quinasas, citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y pequeñas moléculas como las prostaglandinas (41).

En relación con el papel de la tensión y los traumatismos, un reciente estudio de cohortes longitudinal apareado informó que los pacientes con psoriasis con una exposición previa a trauma tienen un mayor riesgo de desarrollar APs (42). Además, un estudio ha demostrado que los pacientes con EspAax-r de larga duración con un mayor nivel de actividad física relacionada con el trabajo durante su vida laboral presentan mayores limitaciones funcionales (43), y el mismo grupo de investigadores informó posteriormente de que actividades ocupacionales, como doblar, torcer y estiramientos, se asociaron con un peor estado funcional y daño radiográfico en pacientes que tienen EspAax-r durante ≥ 20 años.

v. Tabaco

Diversos estudios han investigado la asociación del tabaquismo con la EspAax incidente, con la progresión radiográfica y su asociación con el estrés biomecánico, con la inflamación en RM-SI (44), con la discontinuación del tratamiento (45), además de con una mayor prevalencia de psoriasis y de APs, aunque parece relacionarse con una menor incidencia de manifestaciones periféricas (46).

1.4.2. Progresión de la enfermedad

Una determinada carga genética, una edad más joven al inicio, y la mayor duración de la enfermedad son factores que contribuyen a una tasa de progresión de la enfermedad notablemente más alta (47), siendo factores de riesgo para la progresión radiográfica en las articulaciones sacroilíacas presentar, al comienzo, niveles elevados de PCR, positividad de la RM-SI y una sacroilitis radiográfica de bajo grado, así como dolor de nalgas durante el seguimiento de la enfermedad.

1.4.3. Mortalidad

Los resultados de estudios recientes, con tamaños de muestra generalmente elevados, indican un exceso de la tasa mortalidad en la EspAax-r, siendo las enfermedades cardiovasculares (ECV) y circulatorias (48) (49) (50) las principales causas de mortalidad en dichos pacientes. El aumento del riesgo de mortalidad se asocia con el retraso en el diagnóstico, el aumento de la inflamación y la baja ingesta de AINEs (51), con menos nivel de educación, comorbilidades generales (diabetes, infecciones, enfermedades cardiovasculares, pulmonares y malignas) y la cirugía de reemplazo de cadera (52).

Centrándonos en la mortalidad vascular en las EspAax-r, un gran estudio de cohorte basado en la población de Ontario (Canadá) reportó un hazard ratio (HR) ajustado de 1.36 (IC 95%: 1.13-1.65) para la mortalidad cardiovascular (CV) y cerebrovascular en pacientes comparado con los controles sin la enfermedad (53). El aumento del riesgo de mortalidad fue significativo para los pacientes varones (HR: 1.46, intervalo de confianza -IC- 95%: 1.13-1.87), pero no para las mujeres. De forma interesante, se encontró que el riesgo de muerte vascular estaba asociado de manera negativa con la exposición a AINEs en pacientes de ≥ 65 años de edad. Así mismo, un estudio reciente en EE.UU. que evaluó la causa de muerte entre los pacientes con EspAax-r admitidos en el hospital entre 2007 y 2011 observó que de los 267 pacientes que murieron durante su hospitalización, el 55% presentaban un diagnóstico de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, cuando los datos fueron analizados en base a los principales diagnósticos -la sepsis (14%), las lesiones de la médula espinal (9%), fracturas vertebrales (9%), la insuficiencia respiratoria (6%), y la neumonía (6%), la fractura de la columna cervical con lesión del cordón medular fue la que presentó una asociación más fuerte con la mortalidad en pacientes hospitalizados (54). Curiosamente, un estudio de cohortes finlandés en el que se analizaron las causas de muerte de pacientes con EspAax encontró que el consumo incontrolado de alcohol era un determinante importante en el excedente de muertes por accidentes y violencia en pacientes con EspAax-r (55) y se ha sugerido que este incremento en la mortalidad por causas

de violencia podría explicarse por los elevados niveles de testosterona encontrados en pacientes con EspAax (56).

1.5. Etiopatogenia

La EspAax es una enfermedad multifactorial cuya causa aún no es suficientemente conocida, a pesar de los interesantes avances en su conocimiento de los últimos años. En su etiopatogenia, sobre un individuo genéticamente predispuesto, participan e interaccionan factores medioambientales entre los que se encuentran el estrés biomecánico, las infecciones y la microbiota intestinal, así como factores inmunológicos e inflamatorios. Todos estos factores tejen una compleja red de interrelaciones que provocan tanto la expresión fenotípica característica de la enfermedad como en sus comorbilidades, dentro de las cuales destaca el incremento del riesgo CV (Figura 1).

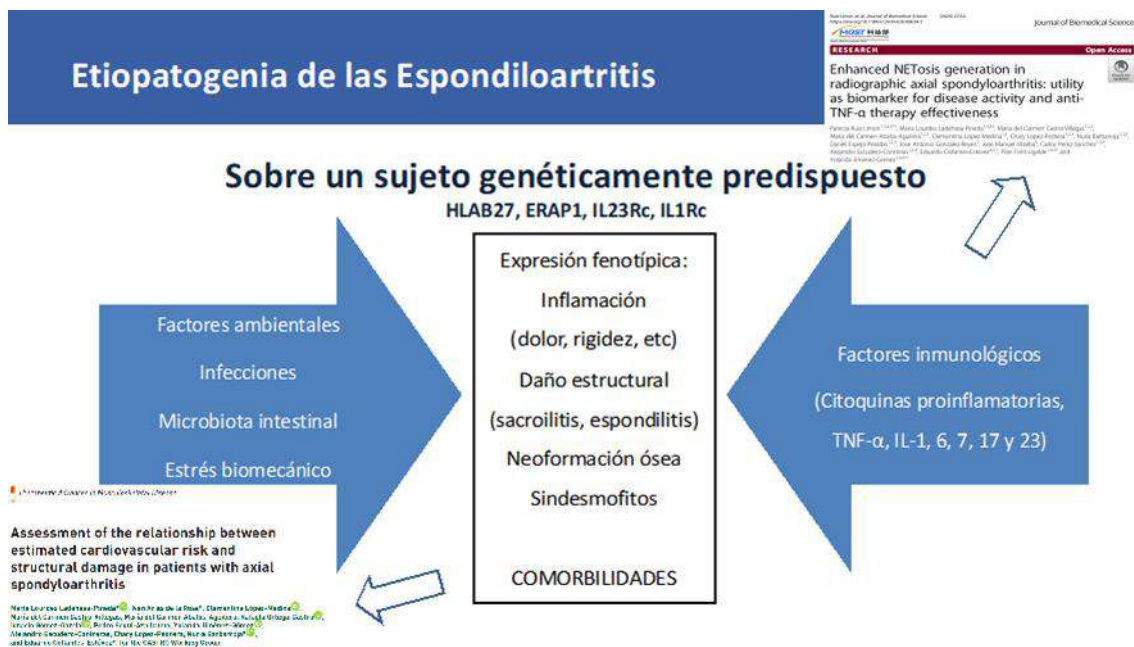


Figura 1. Etiopatogenia de las EspA

1.5.1. Genética de la EspAax

La tendencia de la EspAax a la agregación familiar se reconoció hace mucho tiempo y ha mostrado ser incluso mayor que en la Artritis Reumatoide (AR) (57). En efecto, los análisis agrupados de recurrencia familiar muestran que la probabilidad de desarrollar la enfermedad en gemelos monocigóticos es del 63%, en familiares de primer grado del 8.2%, en familiares de segundo grado del 1.0% y en los de tercer grado del 0.7%. (58). Además, se ha demostrado que la enfermedad no es una monogénica sino, al menos, oligogénica y que la EspAax-nr es genéticamente más heterogénea que la EspAax-r (59).

i. Genética del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

La asociación entre el HLA-B27 – molécula de histocompatibilidad (MHC) de tipo I- y la EspAax fue descubierta en 1973 (33) (35). En concreto, la presencia del gen HLA-B27 se ha observado que contribuye en un 30% en la heredabilidad de la EspAax-r, y dicho gen está presente en el 80-90% de estos pacientes frente al 8-10% de la población general. Hasta la fecha, se han descrito unos 174 alotipos de proteína HLA-B27, siendo el subtipo HLA-B27*05 el más frecuentes y, por tanto, el alelo “ancestral” del que derivan el resto de los subtipos (60). Aún se desconoce el mecanismo por el que este gen da lugar al desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento, se han postulado varias hipótesis, siendo la de mayor peso la "hipótesis del péptido artritogénico", que postula que el HLA-B27 podría presentar péptidos bacterianos o virales y desencadenar una respuesta mediada por los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Si los péptidos presentados mostrasen mimetismo con ciertos péptidos del propio tejido articular, se rompería la tolerancia inmunológica, produciendo daño tisular e inflamación (61). Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos, un péptido artritogénico que provoque la enfermedad en la EspAax-r aún no ha sido identificado.

Así mismo, otras MHC de tipo I se han asociado a la EspAax. En concreto, el locus HLA-A, especialmente el alelo HLA-A*02:01, se ha relacionado también de forma independiente con la EspAax (62), y en la población coreana, se ha observado asociación de esta enfermedad con el HLA-C1502 (63). Además, moléculas de histocompatibilidad no clásicas como los productos de los genes relacionados con cadenas de MHC-I (MIC) se han relacionado con la EspAax en cohortes europeas y asiáticas (64) (65) (66). En concreto, MIC secuencia A (MICA), que codifica una proteína unida a la membrana que interacciona con el receptor NKG2D -también conocido como KLRK1-, para activar la citotoxicidad mediada por los linfocitos T citotóxicos, respuestas de células *natural killer* –NK- y producción de citoquinas (67). Los antígenos MICA son también capaces de inducir la producción de anticuerpos que inducirán la muerte de células infectadas en colaboración con el complemento (68). No obstante, queda por establecer el posible rol que los genes MICA puedan tener en la susceptibilidad a la EspAax (69).

Dada la conocida participación de las células T CD4⁺ en la EspA, no es sorprendente que los alelos del MHC clase II estén también involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Se han encontrado asociaciones entre la EspA con el HLA-DRB1*01 y HLA-DRB1*04:04 en pacientes del Reino Unido y Francia, y también se ha hallado una asociación del locus HLA-DRB1*01:03 con la EspAax-r, la artritis enteropática axial y la enfermedad inflamatoria intestinal (70). Así mismo, estudios comparativos de pacientes EspA con y sin uveítis anterior aguda han demostrado asociaciones con el HLA-DRB1*01:03, DQB1*05 y con el locus HLA-DRB5 (71). Además, dentro

del locus HLA-DP, los alelos HLA-DPA1 y HLA-DPB1 se han implicado con la EspA en otros estudios (72).

ii. *Genética fuera del Complejo Mayor de Histocompatibilidad*

Se han asociado 115 loci no-MHC con la EspAax mediante estudios de genotipado de polimorfismos basados en microarrays de alto rendimiento y estudios de asociación amplia del genoma (GWAS o genome wide association studies) (73) (74) (75).

ii.a. *Vías de citoquinas*

Muchas de las asociaciones genéticas identificadas hasta la fecha incluyen proteínas involucradas en la vía de la interleuquina (IL)-23, del TNF, así como de otras citoquinas asociadas con éstas (76) (77).

Genes de la vía de la IL-23

El gen del receptor de la IL-23 (*IL-23R*), situado en el cromosoma 1p, fue uno de los primeros genes asociados con la EspAax, el cual parece estar también implicado en la patogenia de la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta proteína se localiza en la membrana celular de varios tipos de células del sistema inmune, incluyendo células T, células NK, monocitos y células dendríticas, en las cuales actúa como receptor de la IL-23 e interviene en la producción de IL-17 por parte de las células T *helper* (Th)-17. Los estudios del locus *IL-23R* muestran que la variante SNP rs11209026 (Arg381Gln) conduce a una reducción en la producción de IL-17A e IL-22, un descenso en la fosforilación de STAT3, así como una disminución en los niveles circulantes de células Th-17 y T citotóxicas (Tc)-17, mientras que la variante rs11209032 conduce a un incremento en los niveles de linfocitos Th1 (78).

Otra de las proteínas involucradas en la señalización de la IL-23 es la IL-12p40, una subunidad común para las citoquinas IL-12 y la IL-23, que es codificada por el gen *IL-12B*. Se ha observado que algunos polimorfismos del gen *IL12B* también se asocian con EspAax, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.

En la ruta de señalización mediada por IL-23, las quinasa JAK2 y TYK2 fosforilan a STAT3 induciendo la expresión de ROR γ T necesario para la producción de IL-17. Recientes estudios apoyan el efecto terapéutico de los inhibidores de las JAK en la EspAax (79), señalando su implicación en la enfermedad. Así mismo, se ha observado que la quinasa TYK2 se asocia a la EspAax, mostrando que la variante SNP rs34536443 protege frente a la respuesta al interferón (IFN), la IL-12 y la IL-23 en estos pacientes (80).

ii.b. Genes de la vía del TNF

El gen NFKB1 codifica la proteína NF- κ B, factor de transcripción fundamental de la vía de señalización del TNF, el cual junto con el receptor principal del TNF, el TNFR1, son de gran importancia en la patogénesis de la EspA (81).

ii.c. Genes aminopeptidasa (ERAP-1 y ERAP-2)

Se han encontrado asociaciones de la EspAax con los alelos ERAP1 y ERAP2, localizados en el locus del cromosoma 5q15 (82). ERAP1 y ERAP2 participan en el mecanismo de presentación de antígeno por parte de las moléculas HLA clase I a través del procesamiento y transporte de péptidos antigénicos (83); por tanto una alteración en la expresión o en la estructura de ERAP podría interferir en el papel de los HLA, entre ellos el HLA-B27 y, por tanto, estar implicado en la patogénesis de las EspA. En efecto, se ha observado que la asociación de la enfermedad con ERAP1 se limita a los casos HLA-B27 positivos, o HLA-B40 positivo/HLA-B27 negativo. No obstante, el camino por el que este proceso podría desembocar en EspA aún no se ha desvelado (84).

iii. Epigenética: Asociaciones con genes ADN Metiltransferasa

Los procesos relacionados con la metilación se encuentran implicados en la patogenia de la EspAax, como muestra la asociación de tres genes ADN metiltransferasa- *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L*- con la enfermedad. Estos genes participan en la metilación de *ново*, así como en el mantenimiento de patrones de metilación heredados (85).

1.5.2. Factores medioambientales

i. Microbiota intestinal

La evidencia muestra que en la fisiopatología de la EspAax existe una fuerte interacción entre el microbioma intestinal y el sistema inmunológico genéticamente predispuesto (86) (87).

Se ha observado que hasta el 60-70% de los pacientes con EspAax tienen evidencia de ileítis terminal, una afección parecida a la enfermedad de Crohn, lo que sugiere que la inflamación intestinal es importante en la enfermedad (88). Además, los pacientes con EspAax también tienen una alta prevalencia de niveles elevados de calprotectina fecal, incluso en ausencia de un diagnóstico clínico de enfermedad de Crohn (89). La frecuente coexistencia de factores genéticos y la superposición clínica entre la enfermedad inflamatoria intestinal y la EspAax sugieren que comparten su etiopatogénesis. Esto concuerda con la hipótesis de que una mayor "fuga" del intestino y la potencial capacidad del HLA-B27 de presentar antígenos microbianos puede alterar la composición microbiana del intestino y aumentar la diseminación microbiana

de la mucosa intestinal y, por lo tanto, favorecer la inflamación en la EspAax. Además, existen varios ejemplos que proporcionan una gran evidencia de que el intestino no se ve afectado simplemente por ser un espectador en la EspAax, sino que está directamente involucrado en el desarrollo de la enfermedad. La reducción de la expresión de zonulina, proteína de la barrera intestinal, y la evidencia histopatológica de la invasión bacteriana en la pared intestinal en pacientes con EspAax apoyan aún más esta hipótesis. En 2017, Ciccia *et al.*, (90) hallaron un aumento de lipopolisacáridos séricos en pacientes con EspAax, así como una correlación entre el número de células inflamatorias de la pared de la mucosa con el número de bacterias invasoras. Así mismo, niveles elevados de ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae), anti-I2 (asociado con la actividad anti-Pseudomonas), y anticuerpos anti-CBir1 (antiflagelina) fueron observados en dichos pacientes (91). Esto es de particular importancia dada la conocida participación de las bacterias flageladas en el desarrollo de los linfocitos Th17. Esto plantea la hipótesis de que las bacterias flageladas pueden tener un papel en la patogénesis de la EspAax.

1.5.3. Factores inmunológicos e inflamatorios

i. Alteraciones moleculares: NETosis

Las células del sistema inmunológico son esenciales en la patogénesis de las EspA, y aunque existe un considerable conjunto de evidencias sobre el papel central de los linfocitos T en el proceso patológico (92) (93) (94), el papel de los neutrófilos no se ha examinado en la misma medida en esta enfermedad (95) (96). Es bien conocido el papel de los neutrófilos en la respuesta inmediata a las infecciones, empleando múltiples estrategias que incluyen la fagocitosis, la liberación de enzimas granulares tóxicas y de especies reactivas de oxígeno (ROS), o la generación de NETosis, un tipo de muerte celular específico de los neutrófilos para eliminar microorganismos nocivos. En el proceso de NETosis, los neutrófilos expulsan su contenido nuclear en forma de redes denominadas NETs (del inglés, *neutrophil extracellular traps*) (Figura 2) en la cual capturan y destruyen a los microorganismos invasores (97). Estas redes están compuestas de cromatina (ADN de neutrófilos e histonas de alta afinidad) descondensada que está cubierta de péptidos antimicrobianos y enzimas generadoras de oxidantes (entre ellas, la elastasa de neutrófilos -NE-, la mieloperoxidasa -MPO-, la NADPH oxidasa -NOX- y la óxido nítrico sintetasa -NOS-) (98) (99) (100). La vía de transmisión de señales subyacente que conduce a la formación de las NETs implica la movilización de calcio, mediadores pro-inflamatorios, generación de ROS, delobulación nuclear por NE y MPO, y citrulinación de histonas por la peptidilarginina deaminasa 4 (PAD4), todas ellas esenciales para la descondensación de la cromatina y la extrusión de ADN (99) (101) (102) (103) (104) (105).

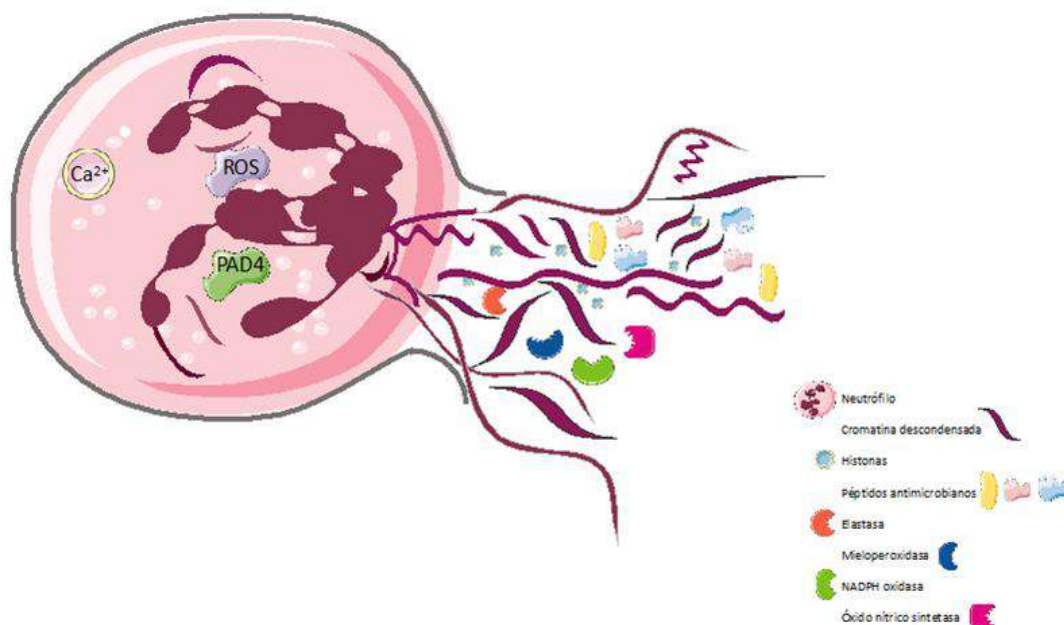


Figura 2. Neutrófilo en proceso de NETosis realizando extrusión del núcleo

Si bien la observación inicial de la formación de las NETs mostró al proceso de NETosis como una estrategia esencial para inmovilizar y destruir a los microorganismos invasores, existen numerosas evidencias que sugieren que la formación aberrante de dichas redes también es fundamental en la etiología de diversas patologías, como la AR y el lupus eritematoso sistémico (LES) (106) (107) (108), ya que pueden promover daño tisular, trombosis, aterosclerosis y autoinmunidad.

En AR, la generación espontánea de NETs se ha detectado en circulación y en el líquido sinovial, observándose una estrecha asociación entre las NETs y parámetros inflamatorios y de autoinmunidad. Ya que PAD4 interviene la citrulinación de histonas durante el proceso de formación NETs, la generación espontánea de NETosis en AR podría ser esencial para la citrulinación de proteínas y los procesos de autoinmunidad. En efecto, se ha demostrado que las NETs en AR son fuentes de autoantígenos citrulinados (109). Por tanto, se ha propuesto un modelo para el papel patogénico de la NETosis en la AR consistente en un loop, en el que las citoquinas inflamatorias y los autoanticuerpos (FR y ACPA) activarían al neutrófilo que produciría NETs, las cuales serían fuentes de autoanticuerpos. Estas NETs, a su vez, podrían activar a los fibroblastos sinoviales que producirían mediadores inflamatorios que promoverían nueva generación de NETosis, provocando así daño articular.

Por su parte, en el LES, los autoanticuerpos típicos de la enfermedad, anti-ribonucleoproteína (RNP) y anti-ADN, podrían ser producidos en respuesta a los componentes de las NETs y, por tanto, participar en el alto nivel de inmunocomplejos circulantes observados en esta patología. Además, los inmunocomplejos con autoantígenos, en particular de RNP/ anti-RNP, pueden promover la liberación de NETs, creando un bucle de amplificación donde la generación de NETosis induce autoanticuerpos que conducen a inmunocomplejos, los cuales a su vez desencadenaría la formación de NETs y perpetuarían este fenómeno. No obstante, el papel de las NETs inducidas por los inmunocomplejos no ha sido clarificado. Por tanto, se postula que otros mecanismos adicionales deben conducir a la ruptura de la tolerancia de las NETs. En este sentido, algunos pacientes con lupus activo o lupus nefrítico muestran una deficiencia en la actividad DNasa 1 y/o anticuerpos anti-NET que inhiben el efecto DNasa, conduciendo a una acumulación anormal de NETs. Esta prolongada presencia de NETs podría favorecer la ruptura de la tolerancia, así como incrementar el daño estructural. Otro elemento interesante es la composición de las NETs de los pacientes lúpicos, la cual es diferente de la observada en los donantes sanos. En concreto, las NETs de los pacientes están enriquecidas en compuestos tóxicos, lo cual promueve daño tisular, especialmente en el lupus nefrítico. Recientes observaciones, sugieren además que varios polimorfismos de PAD4 están asociados al LES y al lupus nefrítico, reforzando la unión entre NETs y la fisiopatología del LES (110).

En EspA, nuestro estudio ha sido el primero en evaluar la generación espontánea de NETs y la regulación de su liberación en dichos pacientes.

ii. Vías inflamatorias

ii.a. TNF

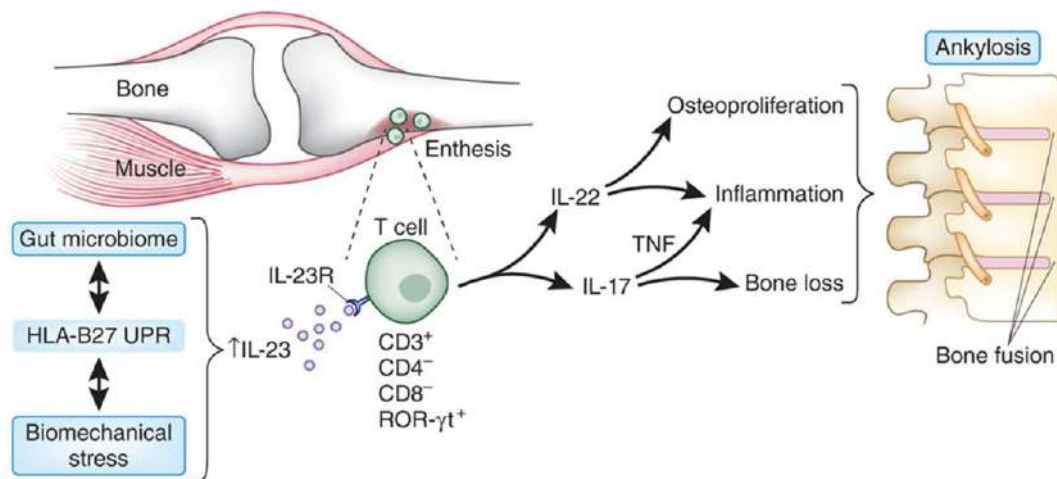
El TNF es una citoquina pro-inflamatoria producida por el sistema inmune (i.e. macrófagos, monocitos, fibroblastos, mastocitos y células NK) que juega un papel esencial en la infección frente a virus, bacterias y parásitos. Sin embargo, su producción sistémica puede desencadenarse a consecuencia de una desregulación de la respuesta inflamatoria e inmune. El papel esencial del TNF en la patogénesis de la EspAax se manifiesta por la eficacia de las terapias anti-TNF en el control de los signos y síntomas de la enfermedad (111). Además, estudios histopatológicos han revelado la presencia de ARNm del TNF en muestras de biopsia de la articulación sacroilíaca (112) y modelos animales de sobreexpresión de TNF muestran además de una polisinovitis destructiva predominante que recuerda a la AR (113), una afectación sinovial de sacroilíacas, entesitis e inflamación intestinal, que parcialmente imita la EspAax humana, características todas ellas que dependen de la expresión en el estroma de su receptor TNFR1 (114). No obstante, el papel concreto del TNF en el desarrollo de la enfermedad precisa

de estudios más completos y concretos para su comprensión, con modelos que se asemejen aún más a la enfermedad y que imiten la sobreexpresión del TNF producida en la EspAax.

ii.b. Eje IL-23/IL-17 y remodelado óseo

El descubrimiento de la vía IL-23/IL-17 ha sido un hito en el conocimiento de los trastornos autoinmunes y se considera que esta vía desempeña un papel crítico en la patogénesis de la EspAax (Figura 3) (115) (116). La IL-23 es producida principalmente por las células presentadoras de antígenos (CPAs) y es necesaria para la estabilización y expansión de las células Th17, células que producen las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21 (117) (118).

IL-23 y Células T Residentes en la Entesis Promueven la Entesitis y la Osteoproliferación en Espondiloartritis



Lories RJ et al. Nat Med 2012;18:1018-9 (con autorización)



Figura 3. La IL-23 y las células T residentes en la entesis promueven la entesitis y la osteoproliferación en las espondiloartritis. Tomado de ASAS slidekit (<http://slides.asas-group.org/app/slides>)

En EspA, se ha observado que los niveles de IL-23 se encuentran elevados en el suero y en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes en relación a sujetos sanos (119). Su elevada expresión se debe a un mal plegamiento de HLA-B27 en el retículo endoplásmico de las células mieloides (13). En 2012, Sherlock *et al.*, (120) mostraron que la IL-23 actúa en células T murinas entesíticas ROR-γt⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ y que la sobreexpresión de la IL-23 era suficiente para inducir entesitis y neoformación ósea, tal y como se observa en los pacientes con EspAax. Como era de esperar, la IL-23 estimuló la producción de IL-22 e IL-17 por

parte de estas células T entesíticas ROR- γ t⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻. La IL-22 y la IL-17 son citoquinas que actúan conjuntamente, aunque sus funciones son opuestas; mientras la IL-17 produce erosión y pérdida de hueso, la IL-22 favorece la remodelación ósea y formación de nuevo hueso (20).

1.5.4. Fisiopatología del hueso

Los cambios óseos en la EspAax no se limitan a la característica formación de nuevo hueso que conduce a la anquilosis, sino que también incluyen la pérdida ósea. La formación de nuevo hueso conduce a la anquilosis de vértebras adyacentes y es la característica distintiva cuando se estudia la progresión estructural de la enfermedad. Además, los cambios estructurales tendrán una consecuencia mecánica, por ejemplo, al provocar un aumento de la carga en los segmentos de la columna vertebral adyacentes a los cuerpos vertebrales anquilosados. Por consiguiente, en el tratamiento clínico de los pacientes con EspAax deben tenerse en cuenta esos factores, y no puede subestimarse la importancia de abordar los problemas biomecánicos además de tratar la inflamación. Por otro lado, la pérdida de hueso puede aparecer como una pérdida ósea sistémica, en particular en los cuerpos vertebrales, y por lo tanto aumentar el riesgo de fracturas de la columna vertebral.

i. Vía de señalización Wnt

La vía de señalización Wnt juega un papel importante en el desarrollo y el crecimiento del esqueleto, como regulador clave de la remodelación homeostática del hueso a lo largo de la vida. El equilibrio entre Wnts y algunos de sus antagonistas de unión extracelular como la esclerostina es esencial en la adaptación del hueso a la carga mecánica. Las proteínas Wnt constituyen una familia específica de al menos 15 glicoproteínas. Las interacciones complejas con diferentes receptores pueden activar diferentes cascadas de señalización, de las cuales la vía canónica dependiente de la β -catenina es la mejor estudiada (121). El impacto de la señalización Wnt en la formación y la anquilosis del hueso nuevo se ha demostrado de manera contundente en un modelo murino caracterizado por la sobreexpresión del TNF (122). Sin embargo, la sobreexpresión sistémica del TNF en humanos se ha visto que conduce a artritis, con predominante erosión de articulaciones y la completa ausencia de formación de nuevo hueso, imitando así a la artritis reumatoide. Esto es probablemente debido a la activación de antagonistas de la vía Wnt. En efecto, la administración de anticuerpos dirigidos contra el antagonista Wnt Dickkopf-1 (DKK1) revierte este proceso, lo que favorecería la expresión de osteoprotegerina, una proteína que bloquea la resorción ósea mediada por el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL). En ausencia de cualquier impacto en la inflamación, el fenotipo de daño estructural cambia dramáticamente de enfermedad erosiva,

con resorción ósea, a enfermedad con formación de nuevo hueso y anquilosis, siendo la señalización Wnt la principal vía en el proceso de formación de los huesos (122). Se han encontrado evidencias del aumento de la expresión de proteínas de la vía Wnt en suero y ligamentos de pacientes con EspAax-r (123). Las articulaciones periféricas son las principales afectadas en este modelo y un estudio ha identificado la inflamación y la formación de nuevo hueso en las articulaciones sacroilíacas (124). De esta forma, los niveles de los antagonistas de la vía Wnt como DKK1 han sido propuestos como biomarcadores de la progresión radiográfica en pacientes con EspAax.

ii. Proteínas Morfogenéticas del hueso (BMPs)

Las BMPs fueron identificadas originalmente como proteínas de la matriz extracelular ósea que eran capaces de inducir, *in vivo*, la formación de nuevo hueso. La primera evidencia de que las BMPs podían jugar un papel en el proceso de anquilosis fue proporcionada por estudios en un modelo de ratón de entesitis anquilosante. El análisis histopatológico mostró que la artritis clínicamente aparente era causada por una fase de inflamación aguda seguida de una extensa remodelación ósea a partir de la entesis (125).

iii. Hedgehogs

La vía de señalización *hedgehog* es clave en el desarrollo y crecimiento de los huesos, ya que estimula la diferenciación de los condrocitos hacia células hipertróficas, favoreciendo así el paso de cartílago transitorio a hueso. Se ha establecido que la inhibición de la señal *hedgehog* reduce la formación de osteofitos en la fase post-inflamatoria de un modelo murino de artritis (126).

1.6. Evaluación clínica de la enfermedad

1.6.1. Biomarcadores

En medicina, un biomarcador, que puede ser químico, físico o biológico, es un indicador medible de la gravedad o la presencia de algún estado fisiológico o de enfermedad (127). En las EspA encontramos los siguientes:

i. Biomarcadores de diagnóstico

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han evaluado los biomarcadores de diagnóstico en pequeños estudios transversales de pacientes con una enfermedad bien establecida, definida según los criterios de clasificación de NYM para EA. Esto es apropiado para la identificación inicial de biomarcadores con potencial diagnóstico, pero estudios posteriores

deberían probar el rendimiento de los biomarcadores en entornos de diagnóstico apropiados.

Son biomarcadores de diagnóstico (128):

- Anticuerpos anti-CD74.
- Anticuerpos contra microbios y metagenómica cuantitativa.
- Anticuerpos contra la proteína fosfatasa dependiente del magnesio 1A (PPM1A).

Se encuentran, además, en fase de investigación biomarcadores de diagnóstico candidatos:

- MiRNAs: El miR-146a y miR-155 se expresan en los pacientes con EspAax respecto a donantes sanos, y el nivel de expresión se correlaciona con los parámetros de la actividad de la enfermedad como la PCR y el Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (129).

ii. Biomarcadores de actividad de la enfermedad

La evaluación de la actividad de la enfermedad en la EspAax se ve limitada por la falta de hallazgos físicos indicativos de inflamación, especialmente en la fase inicial de la enfermedad, y por la falta de sensibilidad de algunos de los marcadores más utilizados:

- PCR: se trata del marcador de inflamación más ampliamente utilizado en la práctica clínica para la evaluación de la actividad en la EspAax, sin embargo, presenta una baja sensibilidad.
- Calprotectina: la proteína de unión al calcio calprotectina es un heterodímero de S100A8 y S100A9 que se ha examinado en el tejido sinovial de pacientes con EspAax. Se expresa en los macrófagos y neutrófilos del tejido sinovial, en el colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y en la piel lesionada de pacientes con psoriasis (130).
- IL-6: se ha evaluado su asociación con la inflamación en RM-SI en pacientes con EspAax que reciben el tratamiento anti-TNF golimumab y se ha encontrado que se encuentra relacionada con la progresión radiográfica (131)
- Proteínas de la familia de las metaloproteinasas: involucrados en la ruptura de proteínas de la matriz extracelular y su presencia se ha relacionado con un exceso de remodelación tisular en pacientes con EspAax en comparación con controles (132).
- Enlaces cruzados amino- y carboxi- terminal (NTX y CTX) de colágeno: se utilizan como biomarcadores para la tasa de recambio óseo. Los niveles séricos de CTX son proporcionales a la actividad osteoclástica (133).

iii. Biomarcadores de respuesta a tratamiento

La PCR sigue siendo el único biomarcador que se utiliza actualmente en la práctica clínica para ayudar a determinar el tratamiento de los pacientes y, junto con la inflamación por resonancia magnética, se ha demostrado que predice la respuesta al tratamiento con anti-TNF- α .

iv. Biomarcadores de pronóstico

- Citoquinas pro-inflamatorias: IL-6, TNF- α y calprotectina, se encuentran asociadas con la progresión radiográfica (131) (134) (135).
- Factor de crecimiento endotelial vascular: promueve la angiogénesis, una característica de la formación de los huesos, especialmente de la osificación condral (136).
- Esclerostina y DKK-1: la esclerostina es una glicoproteína producida principalmente por los osteocitos, que tiene efectos antianabólicos sobre la formación de huesos al inhibir la vía Wnt. El DKK-1 también ejerce efectos antianabólicos sobre la formación de huesos al inhibir la vía Wnt. Junto con la esclerostina, parece predecir la formación de nuevo hueso en la EspAax (122).
- Visfagina, leptina y adiponectina: La adipocina, la visfagina, tiene efectos activadores directos sobre los osteoblastos y en un estudio se ha demostrado que predice la progresión radiográfica en la EspAax independientemente de la PCR (137). Recientemente se ha informado de que los niveles séricos bajos de leptina y de la forma de alto peso molecular de la adiponectina se asocian a la progresión radiográfica en los varones, independientemente de la PCR y del nivel de daño estructural de partida (138).

1.6.2. Evaluación de la actividad de la enfermedad en la EspAax

Dada la escasez de biomarcadores diagnósticos, pronósticos, de actividad de la enfermedad y predictores de respuesta a tratamiento con terapias biológicas, un componente importante de la atención al paciente incluye una evaluación exhaustiva de la actividad de la enfermedad, el daño y la discapacidad. Existen dos tipos de medidas de resultados que se emplean clínicamente: “resultados reportados por el médico” y “resultados reportados por el paciente” (PROs, de inglés *patient-reported outcomes*). Estas medidas de resultados son cuantificables, reproducibles y fácilmente obtenidas en la práctica clínica. La evaluación del estado de la enfermedad en la EspAax comprende la medición del dolor, la rigidez, la fatiga, la función física y la calidad de vida. El grupo ASAS ha establecido un conjunto de variables que deben ser medidas para la evaluación y la monitorización de la EspAax, incluyendo dominios principales y los instrumentos seleccionados para cada dominio.

i. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)

Se trata de la herramienta más utilizada en la práctica clínica diaria y el PRO tradicionalmente empleado para medir la actividad de la enfermedad. Es un cuestionario que evalúa la severidad de la fatiga percibida por el paciente, el dolor espinal, el dolor articular periférico, la sensibilidad localizada, y la cantidad y duración de rigidez matinal utilizando una escala numérica del 1 al 10 o una escala visual analógica de 10 cm, con los síntomas variando de “ninguno” a “muy severo”. La puntuación total se calcula sumando las primeras cuatro preguntas y la media aritmética de las dos últimas, y dividiendo el resultado entre 5. La puntuación varía de 0 (sin actividad de la enfermedad) a 10 (enfermedad muy activa) (139). El punto de corte de 4 se emplea frecuentemente para definir la actividad de la enfermedad, siendo una puntuación de 4 o más sugestivo de alta actividad de la enfermedad (140). No obstante, no se trata de una herramienta infalible, cuando los niveles de BASDAI no correlacionan bien con medidas clínicas de actividad y con los hallazgos por RM-SI.

Dada la comodidad para su realización y la rápida obtención de resultados, el BASDAI se ha utilizado de forma exitosa no solo en la práctica clínica sino que también ha sido el gold standard para medir la actividad de la enfermedad en ensayos clínicos. La herramienta es reproducible y sensible, mostrando mejoría tan pronto como en tres semanas de terapia física. Las limitaciones incluyen que sólo se compone de medidas reportadas por el paciente y que muchos de los 6 ítems que lo conforman son redundantes y no ponderados.

ii. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS)

Esta herramienta mejora la objetividad del BASDAI incluyendo la valoración del paciente del dolor espinal (pregunta 2 del BASDAI), la duración de la rigidez matinal (pregunta 6 BASDAI), dolor y/o tumefacción articular periférico (pregunta 3 BASDAI), estado general, y bien la velocidad de sedimentación globular (VSG) o la PCR de forma ponderada (141). ASDAS recomienda el ASDAS-PCR tanto para ensayos clínicos como para la práctica diaria, pero también se puede emplear el ASDAS-VSG. Diversos estudios han concluido que constituye una mejor herramienta para la evaluación de la actividad de la enfermedad que los PROs y los reactantes de fase aguda, y que correlaciona bien con la presencia de inflamación en sacroilíacas y columna lumbar en resonancia magnética (142) (143) (144).

iii. BASDAI basado en ASDAS-PCR (BASDAS)

Aunque la fórmula ASDAS se definió como el mejor índice compuesto para evaluar la actividad de la enfermedad en pacientes con EspAax, su cálculo podría no ser aplicable en ciertos casos. Además, en algunos proyectos de investigación, especialmente en los anteriores a la

definición del ASDAS en 2009, la puntuación total del BASDAI y la PCR se recogían sin tener en cuenta la necesidad de registrar los valores de las preguntas individuales que componían el índice. Actualmente, al utilizar datos antiguos, parece imposible calcular la actividad de la enfermedad según la norma actual de la fórmula ASDAS. En consecuencia, publicar los resultados de investigaciones antiguas o la realización de estudios prospectivos sin evaluar con precisión la actividad de la enfermedad representa un gran inconveniente. Para resolver este problema, se ha definido una nueva fórmula para calcular el ASDAS introduciendo únicamente el BASDAI y la PCR. Los valores de actividad de la enfermedad obtenidos con esta nueva fórmula arrojan resultados muy similares a los de la fórmula original del ASDAS original. Esta fórmula se ha denominado BASDAS y permite reutilizar antiguos datos proporcionando un método sencillo de evaluación de la actividad de la enfermedad (145).

iv. Medidas individuales para evaluar la actividad de la enfermedad

iv.a. Dolor y Rigidez

Habitualmente el dolor se evalúa utilizando una escala visual analógica (EVA) o numérica (se prefiere numérica). Al paciente se le pregunta sobre la cantidad de dolor en columna, así como sobre el dolor nocturno y se anota en la escala. La rigidez matinal se evalúa preguntándole al paciente sobre la intensidad y la duración. Las puntuaciones oscilan de 0 a 10, siendo 0 la ausencia de dolor y de rigidez en cada caso. Es importante diferenciar entre causas mecánicas e inflamatorias al evaluar el dolor y la rigidez por el impacto en las medidas terapéuticas.

iv.b. Fatiga

Hasta el 65% de los pacientes con EspAax refieren la presencia de fatiga. Se evalúa en la primera pregunta del BASDAI y además se ha validado un instrumento empleado en ensayos clínicos, la subescala *Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue* (FACIT-Fatigue) (146).

iv.c. Evaluación Global del Paciente

Normalmente se explora mediante la pregunta “¿Cómo de activa ha estado su enfermedad reumática en la última semana?” y la respuesta se registra en escala visual analógica o numérica de 0 (no activa) a 10 (muy activa).

1.6.3. Evaluación de entesitis y afectación de las articulaciones periféricas

Los principales instrumentos para la evaluación de la inflamación de las entesis son el Berlin Enthesitis Index (BEI) (147), el Maastricht AS Enthesitis Score (MASES) (148) y el San Francisco Index (149). Tanto el MASES como el BEI se incluyen en las recomendaciones ASAS. La afectación

articular periférica, por su parte, se puede realizar utilizando el recuento de 44 articulaciones. La presencia de inflamación también se cuantifica y la puntuación varía de 0 a 44, siendo 0 ausencia de entesitis y 44 el mayor grado.

1.6.4. Evaluación de la función física

La monitorización de la función física es un resultado importante, ya que la movilidad espinal limitada y la disminución de la función es un factor de mal pronóstico en estos pacientes. Los estudios muestran que la función física en pacientes con EspAax se encuentra influenciada no sólo por el daño estructural, sino también por la actividad de la enfermedad (inflamación) (150) (151). Sin embargo, influyen otros factores como la situación psicológica y la habilidad para manejar la enfermedad. Las herramientas utilizadas para evaluar la función física en pacientes con EspA son las siguientes:

i. Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI)

Consta de 10 preguntas relacionadas con actividades de la vida diaria, que se puntúan con una escala del 0 (sin daño funcional) al 10 (máximo daño funcional). Contiene 8 ítems que pertenecen al ámbito de las tareas diarias y dependen de la anatomía funcional, y 2 ítems que evalúan la capacidad del paciente para adaptarse a la vida diaria. El índice global es la media aritmética de las puntuaciones en cada pregunta (152).

ii. Dougados Functional Index

Mide la capacidad funcional de una persona evaluando diversas actividades de la vida diaria; aborda aspectos como vestirse, bañarse, estar de pie, subir escaleras, agacharse, cambiar de posición, realizar tareas domésticas, toser y respirar profundamente. Utiliza una escala de respuesta Likert de 3 puntos, como sigue: 0 = sí, sin dificultad; 1 = sí, pero con dificultad; y 2 = imposible de hacer. Las puntuaciones de los ítems se suman para obtener un índice funcional total entre 0 y 40. Se ha utilizado en estudios de la enfermedad y en ensayos clínicos y es considerablemente más largo que el cuestionario BASFI, por lo que no es factible para la clínica (153).

1.6.5. Evaluación de la movilidad espinal

i. Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI)

Se desarrolló con el fin de evaluar el estado espinal (cervical, dorsal, lumbar y de caderas) de los pacientes con EspAax y para identificar cambios en la movilidad espinal. Incluye cinco medidas clínicas: distancia trago-pared, rotación cervical, test de Schober modificado, flexión lateral espinal, y distancia intermaleolar (154). Además, ASAS ha recomendado su empleo en la

evaluación de la movilidad espinal en la EspAax, junto con otras medidas individuales: expansión torácica, test de Schober modificado, distancia occipucio-pared, rotación cervical y flexión lateral espinal.

ii. *University of Córdoba Ankylosing Spondylitis Metrology Index (UCOASMI)*

Se trata de un índice metrológico obtenido mediante un sistema de capturas del movimiento por vídeo (UCOTrack™) tras la colocación de unos sensores en puntos determinados del cuerpo del paciente (155).

1.6.6. Estado funcional y de salud, incluyendo la calidad de vida

i. *The ASAS Health Index (ASAS HI)*

Herramienta elaborada por ASAS para valorar adecuadamente la función global, incluyendo las limitaciones en actividades o la participación social de los pacientes. (156,156)

1.7. Imagen en EspAax

Actualmente se utilizan cuatro métodos principales para evaluar las articulaciones sacroilíacas y la columna vertebral de los pacientes con EspAax: radiografía simple, tomografía computarizada, gammagrafía y resonancia magnética. La evaluación de las articulaciones periféricas y las entesis se realiza mediante ecografía.

1.7.1. Radiología simple

La radiografía simple de las articulaciones sacroilíacas sigue siendo la piedra angular de la evaluación diagnóstica y la clasificación de la EA. Las anomalías se limitan al hueso esponjoso y/o cortical e incluyen esclerosis focal o difusa, erosión y anquilosis. Hasta hace poco, la EspAax se ha sido clasificado en base a los hallazgos radiográficos de sacroílitis inequívoca, tal como se describe en la versión modificada de los criterios Nueva York (6). Los cambios radiográficos se califican de acuerdo con la gravedad de las anomalías en las articulaciones sacroilíacas. Para la clasificación de la enfermedad como EspAax-r, es necesaria la presencia de al menos un grado 2 bilateral, definido por pequeñas zonas localizadas con erosión o esclerosis sin alteración en la amplitud del espacio articular, o un grado unilateral 3, definido por una o más erosiones definidas, esclerosis, ensanchamiento, o estrechamiento. Sin embargo, la llegada de la resonancia magnética ha puesto de manifiesto la baja sensibilidad de la radiología simple para el diagnóstico de las formas precoces de EspAax.

La radiografía simple puede mostrar una variedad de características en la columna vertebral, siendo el hallazgo más temprano la pérdida de la cortical en la esquina del cuerpo vertebral

dando la apariencia de una erosión. La remodelación ósea y la formación de nuevo hueso llevan a la apariencia radiográfica de la cuadratura y esclerosis en la esquina vertebral. Además, la neoformación ósea que se extiende verticalmente desde la esquina vertebral a través del espacio del disco hasta la esquina vertebral adyacente en la forma de un sindesmofito puede, en última instancia, conducir a una anquilosis completa. Esto ocurre no sólo en el borde de la vértebra, sino también en el interior del disco. El método principal utilizado para evaluar la progresión en la columna vertebral es el *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score* (mSASSS), que evalúa la esclerosis, la erosión, la cuadratura, los sindesmofitos, y la anquilosis en las esquinas vertebrales anteriores de la columna cervical y lumbar en las radiografías laterales. Para una esquina vertebral individual, la presencia de anquilosis (puente óseo) se puntúa como 3, un sindesmofito tiene una puntuación de 2, y las anomalías restantes reciben cada una puntuación de 1. El rango de puntuación total es de 0 a 72. Se requiere un seguimiento de al menos 2 años antes de que un cambio fiable pueda ser detectado, y en este marco de tiempo, alrededor del 40% de los pacientes muestran una progresión radiográfica (157) (158).

1.7.2. Resonancia magnética

Un grupo de expertos de la *European League Against Rheumatism* (EULAR) concluyó que la evaluación de las articulaciones sacroilíacas mediante RM-SI debe realizarse si el diagnóstico de EspAax no puede ser establecido sobre la base de las características clínicas y de la radiografía convencional y aún así continúa la sospecha de EspAax (159). La RM-SI es más útil para diagnosticar aquellos pacientes con una sospecha clínica de lumbalgia inflamatoria que son HLA-B27 positivos, tienen una radiografía normal o equívoca de las articulaciones sacroilíacas, insuficiente respuesta sintomática a los AINEs, y se consideran candidatos a una terapia más intensiva. Para los propósitos de clasificación de la EspAax, se han publicado unos criterios de RM-SI positiva de acuerdo con la opinión consensuada de reumatólogos y radiólogos expertos en la materia (160). Esta definición se basa en la clara presencia de edema de médula ósea (EMO)/osteítis en el hueso subcondral en una secuencia de supresión de grasa o de aumento de contraste. La definición se cumple cuando hay al menos dos lesiones en un único corte semicoronal o cuando una sola lesión está presente en dos cortes consecutivos. Es importante tener en cuenta que esta definición no se aplica con fines diagnósticos.

La RM-SI suele ser suficiente para la evaluación diagnóstica de rutina de la EspA, pero las imágenes de la columna vertebral pueden estar indicadas en el caso de síntomas localizados de la columna. Las lesiones más tempranas que se identifican en la imagen de resonancia magnética son inflamatorias y aparecen primero en la articulación sacroilíaca en secuencias con

supresión grasa (por ejemplo, STIR) y/o resonancia magnética con contraste como capsulitis, sinovitis e inflamación subcondral de la médula ósea. La biopsia directa guiada por tomografía axial computarizada (TAC) de las articulaciones sacroilíacas ha mostrado correlaciones significativas entre la inflamación en la RM-SI y el grado histopatológico de la inflamación. A medida que el EMO evoluciona en la articulación sacroilíaca, las erosiones se hacen visibles y se observa pérdida de hueso subarticular en la secuencia T1 en la que se potencian las lesiones grasas. La confluencia de múltiples erosiones puede resultar en una erosión extendida a lo largo de la vertical de la cortical ilíaca. Cuando la inflamación se resuelve, aparece un nuevo tejido con alta intensidad de señal en la secuencia ponderada T1, tanto en la cavidad de la erosión como en la médula ósea subcondral adyacente, por acumulación de ácidos grasos y, por lo tanto, se ha denominado metaplasia grasa. Cuando esta imagen se observa en la cavidad de una erosión previamente activa se denomina *backfill*. La metaplasia grasa en la articulación sacroilíaca está asociada con el desarrollo de la anquilosis (161).

1.8. Comorbilidades

1.8.1. ECV

La carga CV en las enfermedades reumáticas inflamatorias ha sido bien descrita (162) (163) y se han desarrollado recomendaciones para su prevención y tratamiento, aconsejando el uso de antihipertensivos y estatinas (164), y cautela en lo que respecta a la administración de AINEs y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos (FAMEsb) a pacientes que ya presentan ECV (165). Recientemente, esta carga CV se ha puesto de relieve en el contexto de la EspA, y la mayoría de los estudios coinciden en la presencia de un mayor riesgo CV en estos pacientes que en la población general (166), siendo la ECV una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (20-40%) en pacientes con EspAax-r (167). Varios son los factores que podrían conducir al desarrollo de ECV y aterosclerosis, el proceso más común que conduce a ECV. Los factores de riesgo tradicionales clásicos tales como la hipertensión y un perfil de lípidos aterogénico (168) (169) juegan un papel crucial, pero no explican completamente la elevada prevalencia de aterosclerosis detectada en este trastorno (170). Por tanto, es probable que el estado inflamatorio generalizado observado en estos pacientes los haga más propensos a desarrollar ECV. En este sentido, se ha observado que niveles de PCR bajos en pacientes con EspA se asocian con ausencia inicial de enfermedad vascular y riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular isquémico y muertes por enfermedades vasculares y no vasculares (171). Además, el tratamiento de la inflamación en pacientes con EspAax-r se ha relacionado con una reducción de la enfermedad de las arterias coronarias y la aterosclerosis (172).

A la hora de evaluar la ECV, se deben tener en cuenta los factores de riesgo CV, que son aquellos trastornos o conductas que contribuyen al desarrollo de un acontecimiento cardíaco o vascular, así como el evento cardiovascular, que se trata de un acontecimiento producido en el corazón o vasos sanguíneos como consecuencia de la combinación de diferentes factores de riesgo CV.

i. Factores de riesgo CV

Se dividen en dos tipos: modificables y no modificables. Los primeros son aquellos que se pueden modificar mediante un tratamiento o bien cambiando los hábitos de vida. Los factores de riesgo no modificables son aquellos en los que no podemos influir [edad y sexo (hombres de más de 45 años y mujeres de más de 55 años) o historia familiar de herencia positiva].

i.a. Factores de riesgo CV modificables

- *Hiperlipidemia.* Son un grupo de alteraciones del metabolismo de las grasas que se caracteriza por dar lugar a un aumento de una o varias fracciones lipídicas en sangre. Los dos tipos de grasas circulantes más importantes son el colesterol y los triglicéridos. Se pueden clasificar en hipercolesterolemias, hipertrigliceridemias o aumento de los niveles de triglicéridos, e hiperlipemias mixtas en las que aumentan tanto el colesterol como los triglicéridos. La hipercolesterolemia se define como niveles de colesterol total por encima de 250 mg/dL en pacientes que no han sufrido eventos CV previos (prevención primaria) y de 200 mg/dL para aquellos que han sufrido un evento previo o que son diabéticos (prevención secundaria). Sin embargo, el mejor predictor de riesgo CV es la concentración de colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C; ≥ 160 mg/dL). La hipertrigliceridemia, por su parte, se define en prevención primaria cuando los triglicéridos son ≥ 200 mg/dl y en prevención secundaria cuando los triglicéridos son ≥ 150 mg/dl (173).
- *Hipertensión.* La hipertensión arterial (HTA) se define como la presión sanguínea persistente de $\geq 140/90$ mmHg y afecta a un cuarto de la población adulta. La HTA es uno de los factores modificables esenciales de mortalidad prematura en todo el mundo, siendo el factor de riesgo CV independiente más importante. De entre los factores que pueden alterar la tensión nos encontramos con la edad, el sexo, el ritmo circadiano, el índice de masa corporal (IMC), la actividad física, el estrés psicológico, el estado hormonal y la ingesta de sodio y potasio (174).
- *Diabetes.* La *diabetes mellitus* es el término colectivo para definir trastornos metabólicos heterogéneos cuyo principal hallazgo es la hiperglucemia crónica. La causa

es una secreción de insulina alterada (tipo I) o una alteración del efecto de la insulina en los órganos diana (tipo II), o generalmente ambas. El diagnóstico puede realizarse mediante 4 formas: 1) valor de glucemia en plasma de ≥ 200 mg/dl, 2) glucosa plasmática en ayunas de ≥ 126 mg/dl; 3) prueba de tolerancia oral a la glucosa, con un valor de glucosa en plasma venoso a las 2 horas ≥ 200 mg/dl y 4) y un valor de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) de $\geq 6.5\%$ (175).

- *Obesidad.* Se define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa. Para detectarla, se emplea el IMC, que se calcula como el peso corporal en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados (kg/m^2). Según el IMC los individuos se pueden clasificar en cinco categorías diferentes: 1) normal: 18.5-24.9 kg/m^2 ; 2) sobrepeso: 25.0-29.9 kg/m^2 ; 3) obesidad tipo 1: 30.0-34.9 kg/m^2 ; 4) obesidad tipo 2: 35.0-39.9 kg/m^2 ; 5) obesidad tipo 3: ≥ 40 kg/m^2 . En cuanto a la obesidad, definida como $\text{IMC} \geq 30$ kg/m^2 , es la obesidad abdominal la que se asocia con un incremento del riesgo y ECV (176). Así mismo, este tipo de obesidad es el componente más frecuentemente observado en el síndrome metabólico, una alteración que se define como la presencia de obesidad abdominal, dislipidemia, hiperglucemia e hipertensión. El síndrome metabólico es uno de los principales desafíos de salud pública, ya que presenta una prevalencia media del 31%, y se asocia con un aumento del doble del riesgo de enfermedad coronaria y cerebrovascular, y con un aumento de 1.5 veces en el riesgo de todas las causas de mortalidad (177).
- *Tabaquismo.* El tabaco es un factor de riesgo dominante de mortalidad y morbilidad CV y no CV. Se estima que para el año 2025 habrá 1.600 millones de fumadores en el mundo, y que 10 millones de personas al año morirán por fumar. El riesgo a diez años de eventos CV fatales se duplica en los fumadores y fumar de forma pasiva también se ha demostrado que aumenta el riesgo de sufrir ECV (178).
- *Actividad física inadecuada.* La inactividad física es un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades CV, pero también para el desarrollo de otras enfermedades crónicas. Hasta el 60% de la población mundial no cumple con el mínimo recomendado de 30 minutos diarios de actividad física moderada. El riesgo de ECV aumenta 1.5 veces en las personas que llevan un estilo de vida sedentario. La inactividad física causa 2 millones de muertes por año y el 22% de todas las enfermedades cardíacas isquémicas (178).

i.b. Factores de riesgo cardiovascular no modificables

- *Edad*: se considera que el riesgo CV se incrementa en los hombres de más de 45 años y mujeres de más de 55 años, además de en la menopausia (179).
- *Sexo*: las mujeres de menos de 55 años presentan un menor riesgo CV (179).
- *Historia familiar de ECV*: Los individuos con antecedentes familiares de enfermedades cardíacas prematuras antes de los 50 años de edad tienen un mayor riesgo de mortalidad por ECV (179).

Así mismo, fuera de estos dos grupos, se encuentra la insuficiencia renal, la cual se asocia con un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad CV (179).

ii. Eventos Cardiovasculares

Los eventos CV son episodios producidos en el corazón o vasos sanguíneos como consecuencia de la combinación de diferentes factores de riesgo CV. Entre estos se incluyen la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular, las arteriopatías periféricas, la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar.

iii. Evaluación del riesgo CV

Se han desarrollado fórmulas que permiten predecir y cuantificar el riesgo de eventos cardiovasculares de forma individual mediante la realización de valoraciones relativas de los factores de riesgo CV. Las fórmulas más utilizadas son:

- Índice de Framingham: se utiliza para estimar el riesgo de ECV de forma individual a 10 años vista. Incluye los factores de riesgo CV clásicos como son edad, sexo, tensión arterial, niveles de LDL-C, HDL-C, hábito tabáquico y diabetes. El resultado varía desde <5% (correspondiente a riesgo bajo) a $\geq 15\%$ (riesgo alto). Este índice se desarrolló en cohortes de pacientes estadounidenses, por lo que su validez en poblaciones europeas es cuestionada. (180)
- Tablas de Estimación de Riesgo Coronario Sistémico (Systemic Coronary Risk Estimation [SCORE]), que desde 2003 es el recomendado por las Directrices Europeas sobre la prevención de las enfermedades CV en la práctica clínica (181). El sistema SCORE estima el riesgo a 10 años de un primer evento aterosclerótico fatal en base a la edad, el sexo, la tensión arterial sistólica, el colesterol total en suero y el estatus de fumador actual, siendo la edad la variable con mayor influencia. Se consideran eventos ateroscleróticos la enfermedad arterial coronaria, el accidente cerebrovascular y el aneurisma de la aorta abdominal (Figura 4).

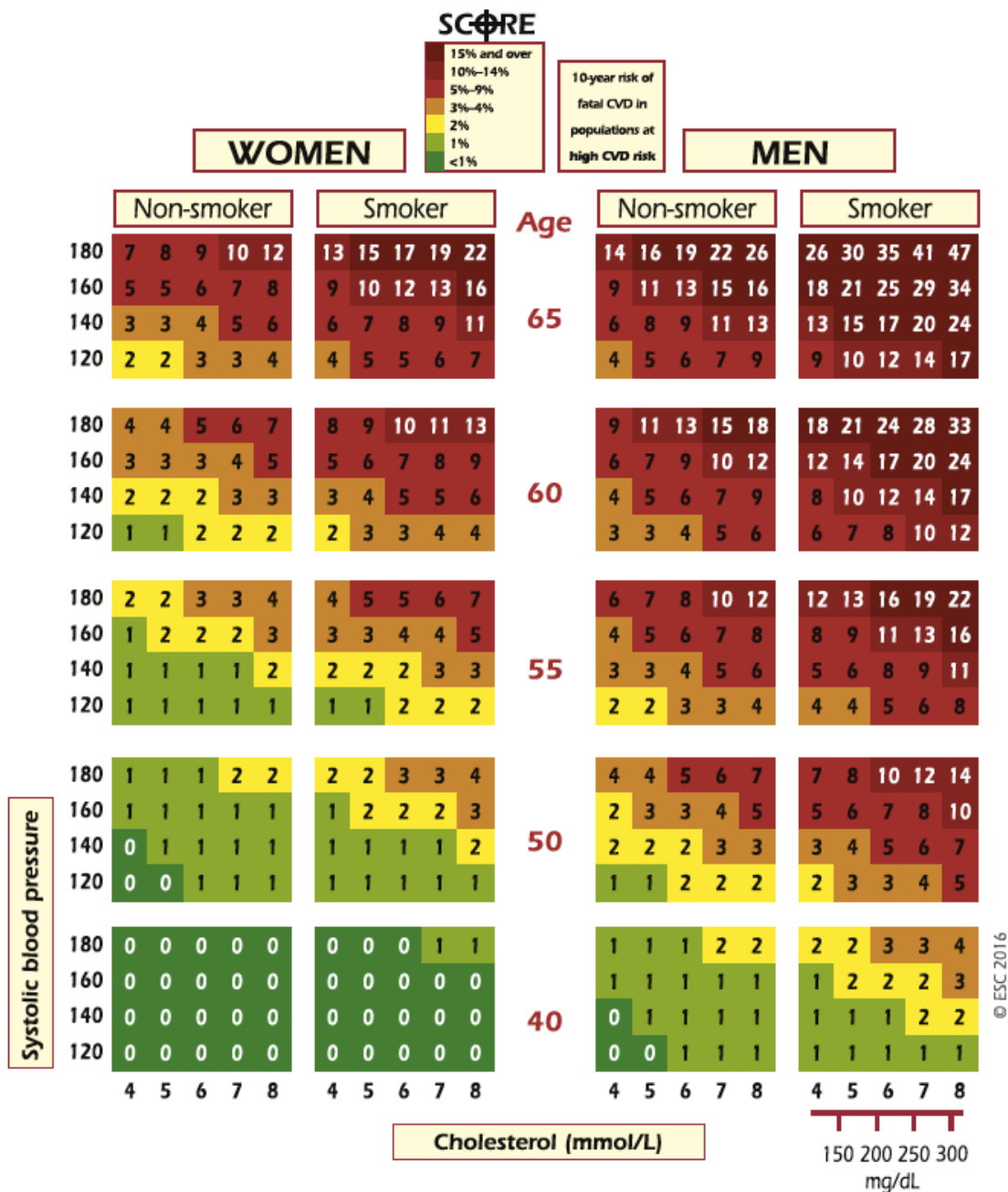


Figura 4. Tabla SCORE: Riesgo a 10 años de enfermedades cardiovasculares mortales en poblaciones de países con alto riesgo cardiovascular basado en los siguientes factores de riesgo: edad, sexo, tabaquismo, presión arterial sistólica, el colesterol total. CVD: enfermedades cardiovasculares; SCORE: Estimación del riesgo coronario sistemático.

iv. Enfermedad CV en EspA

iv.a. Aortitis y enfermedad valvular cardíaca

La aortitis, que afecta a la raíz aórtica y que conduce a la insuficiencia aórtica y mitral, es una de las comorbilidades graves más comunes asociadas con la EspAax. Se ha observado la presencia de insuficiencia aórtica en el 0%-34% de los pacientes, y la insuficiencia mitral en el 5%-74% de ellos (182).

iv.b. Anomalías de la conducción

La extensión de la inflamación y la formación de cicatrices desde la raíz aórtica hasta el tabique interventricular puede provocar bloqueos de la conducción auriculoventricular, bloqueos del haz y bloqueos fasciculares. Estas alteraciones de la conducción pueden afectar hasta el 35% de pacientes, dependiendo de los tipos de anomalías de la conducción considerados. La presencia de anomalías puede ser intermitente. El bloqueo cardíaco de tercer grado, el tipo más grave, afecta al 0%-9% de los pacientes (183).

iv.c. Disfunción miocárdica

El trastorno más común de la función miocárdica en la EspAax es la disfunción diastólica, en la mayoría de los casos debida a la reducción en la relajación del ventrículo izquierdo. En estudios de pacientes con EspAax que no tenían evidencia clínica o electrocardiográfica de enfermedades cardíacas o valvulares, la prevalencia de disfunción diastólica osciló entre el 12% y el 53% (184).

iv.d. Aterosclerosis

Como se indicó previamente, el proceso patológico más común que conduce a ECV es la aterosclerosis, una enfermedad de las arterias de mediano y gran calibre, cuya prevalencia es 1,5 veces superior en pacientes con EspAax-r que en los controles sanos (185). Esta patología se caracteriza por la formación de placas, consistentes en núcleos necróticos, regiones calcificadas, acumulación de lípidos modificados, células del músculo liso inflamadas, células endoteliales activadas, leucocitos y células espumosas. Estas características de las placas ateroscleróticas demuestran que la aterosclerosis es una enfermedad compleja, y que diversos componentes del sistema inmune, vascular y metabólico están involucrados en este proceso.

En pacientes con EspAax se ha observado una prevalencia incrementada de aterosclerosis subclínica (186), la cual se caracteriza por un engrosamiento patológico de la íntima media carotídea (187) y rigidez arterial (188) (189). Varios son los factores que podrían conducir al desarrollo de aterosclerosis subclínica. Entre ellos, a parte de los factores de riesgo tradicionales clásicos indicados previamente, nos encontramos la inflamación sistémica. En efecto, se ha observado que esta aterosclerosis subclínica es menos frecuente entre los pacientes con actividad persistentemente baja de la enfermedad o en tratamiento con anti-TNF- α , sugiriendo el papel etiológico de la inflamación sistémica (190). Además, se ha establecido que en los pacientes con EspA sin ECV manifiesta, la disminución de la función renal y el daño radiográfico son también condiciones asociadas al desarrollo de la aterosclerosis acelerada subclínica observada en esta patología (191).

1.8.2. Enfermedad pulmonar

i. Enfermedad pulmonar restrictiva

Se produce como resultado de las limitaciones en el movimiento de la pared torácica debido a la fusión costo-vertebral, costo-esternal y vertebral torácica. En ausencia de actividad física regular, el compromiso respiratorio puede pasar desapercibido porque la respiración diafragmática puede ser suficiente para satisfacer las demandas bajas. Además de la restricción debida a la fusión torácica, los síntomas agudos que afectan a la pared torácica anterior, articulaciones costo-vertebrales, o la parte superior de la columna vertebral pueden causar limitaciones temporales en la ventilación. Los hallazgos en las pruebas funcionales respiratorias muestran una baja capacidad vital forzada y normalidad o incremento de la capacidad pulmonar total y el volumen residual. La prevalencia oscila entre el 15% y el 57% (192).

Los defectos pulmonares restrictivos son en gran parte asintomáticos pero pueden complicar otras patologías pulmonares agudas, como infecciones, necesidad de ventilación mecánica o enfermedades pulmonares secundarias como el enfisema. Por esta razón, la prevención contra el tabaquismo para reducir la probabilidad de obstrucción del pulmón es crítica en los pacientes con EspAax-r.

ii. Enfermedades pulmonares parenquimatosas

Históricamente, la manifestación parenquimatosa más específica en la EspAax ha sido la enfermedad fibrobullosa apical (193), una enfermedad en la cual nódulos e infiltrados apicales progresan lentamente a fibrosis y formación de cavidades. La etiología es desconocida, se desarrolla en pacientes con enfermedad de larga evolución y es asintomática durante un periodo prolongado de tiempo, aunque la tos, disnea y neumotórax espontáneo pueden intercurrir. En los últimos años parece haber disminuido su prevalencia.

Así mismo, se han descrito otras enfermedades parenquimatosas en pacientes con EspAax, incluyendo enfermedad pulmonar intersticial, alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, bronquiectasias, y enfisema centrolobulillar, a menudo en reportes de casos o series de casos no controladas (194) (195) (196).

iii. Apnea obstructiva del sueño

Se han descrito series de casos en las que se ha observado un incremento de la prevalencia de apnea obstructiva del sueño en pacientes con EspAax. Entre las causas potenciales de este trastorno se encuentran las alteraciones en la anatomía cervical (197) (198).

1.8.3. Enfermedad renal

i. Amiloidosis secundaria

Es un trastorno poco común que se produce cuando una proteína anormal, llamada amiloide, se acumula en tejidos y órganos e interfiere en su funcionamiento normal. En EspAax, se ha mostrado una prevalencia de amiloidosis secundaria subclínica en el 7% de los pacientes y de amiloidosis renal secundaria en el 0.1%- 1.1% de los mismos. En el caso de la amiloidosis renal, se ha mostrado que su frecuencia en los pacientes con EspAax incrementa con una mayor duración de la enfermedad y edad, parámetros elevados de inflamación sistémica y con la presencia de artritis periférica. El tratamiento con anti-TNF ha resultado en una mejora de la proteinuria y la función renal (199) (200).

ii. Nefropatía IgA

La proporción de pacientes con EspAax que tienen una nefropatía por IgA oscila entre el 0% y el 3.1% según algunas series de casos (201). Sin embargo, no se han realizado estudios epidemiológicos para esclarecer si la nefropatía por IgA se produce con mayor frecuencia en pacientes con EspAax que en controles sanos. No obstante, se sospecha de una asociación como consecuencia de la coexistencia de nefropatía por IgA y de inflamación en enfermedades intestinales, enfermedades que comparten algunos marcadores genéticos y elevados niveles séricos de IgA con los pacientes con EspAax.

iii. Urolitiasis

Se ha observado un incremento del riesgo de urolitiasis en pacientes con EspAax que podría deberse a alteraciones en la homeostasis del calcio y, posiblemente, a enfermedad ileal subclínica, de forma análoga a los mecanismos que conducen a la urolitiasis en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales. (202)

1.8.4. Enfermedades genitourinarias y gestación

i. Infecciones genitourinarias en el varón

Una encuesta nacional en Islandia reportó que el 27% de los hombres con EspAax-r tenía antecedentes de prostatitis (203), y junto con la uretritis, a menudo asociada a las infecciones por Chlamydia, se han encontrado en el 13% de los pacientes con EspAax-r (204). Así mismo, los varicoceles también son más comunes entre los hombres con EspAax-r (205), posiblemente inducidos por las frecuentes maniobras de Valsalva durante el episodio de dolor lumbar.

ii. Disfunción sexual

Los hombres con EspAax-r generalmente reportan de más problemas con la función eréctil, la función orgásmica, el impulso sexual, la satisfacción del coito, y satisfacción en general, manifestaciones directamente correlacionadas con la severidad de los síntomas inflamatorios y la depresión, estimándose la prevalencia de la disfunción eréctil entre el 4.7% y el 35% (206). Aunque los datos son limitados, las mujeres con EspAax-r generalmente no reportan mayores problemas con el funcionamiento sexual, excepto un menor deseo (207).

iii. Gestación

La EspAax no afecta a la fertilidad. En cuanto a la gestación, los síntomas inflamatorios no mejoran claramente durante el embarazo, como es común en las mujeres con AR, y el dolor mecánico de espalda a menudo empeora durante el tercer trimestre. Los riesgos de complicaciones obstétricas no son diferentes en mujeres con EspAax-r, aunque el parto por cesárea es más frecuente y puede existir un mayor riesgo de parto prematuro (208).

1.8.5. Osteoporosis y fracturas

La osteoporosis vertebral se conoce desde hace tiempo como una característica común que afecta a la columna vertebral anquilosada, y este hallazgo se ha atribuido tradicionalmente tanto a la inmovilidad como a la descarga mecánica del hueso trabecular vertebral (209). No obstante, la baja densidad ósea vertebral también se ha encontrado en pacientes con EspAax temprana, físicamente activos y sin sindesmofitos (210). Los estudios de la densidad mineral ósea (DMO) de la columna lumbar y el cuello femoral en pacientes con EspAax-r muestran que entre el 31% y el 38.1% de los pacientes presenta osteopenia y del 10.9% al 16.1% osteoporosis. La presencia de una baja DMO vertebral desde el inicio de la enfermedad subraya el papel de la inflamación como mediador en este proceso y muchos estudios transversales muestran la asociación de la baja DMO con la elevación de reactantes de fase aguda (211). Además, estudios prospectivos han mostrado que la pérdida de hueso en 2-5 años fue mayor en pacientes con una inflamación sistémica más persistente, como se refleja en la elevación de VSG o PCR (212). También la presencia de EMO en la resonancia magnética de la columna vertebral o de las articulaciones sacroilíacas ha sido asociada con una baja DMO vertebral, apoyando aún más el papel de la inflamación (213). Estas asociaciones son consistentes con las acciones conocidas de la IL-1, IL-6, TNF- α , e IL-17 en la promoción de la osteoclastogénesis, así como la resorción ósea y la inhibición de los osteoblastos (214). El bajo IMC y la artritis de cadera también puede ser un factor de riesgo para la baja DMO vertebral (215). En cuanto al tratamiento, no existe consenso,

aunque los expertos recomiendan los bifosfonatos en el marco de una osteoporosis severa o presencia de fracturas y los anti-TNF.

La complicación más severa de la osteoporosis es la fractura vertebral, la cuales afectan más frecuentemente a las vértebras torácicas medias y que se produce bien por compresión o por traumatismos. Las fracturas por compresión pueden exacerbar la hipercifosis en la EspAax-r y están asociadas con mayores limitaciones funcionales. En las cohortes clínicas, la proporción de los pacientes con al menos una fractura vertebral oscila entre el 10% y el 41% (216) y en un estudio de cohorte de España, el riesgo era dos veces mayor entre los pacientes con EspAax-r (217).

1.8.6. Enfermedades neurológicas

i. Lesión de la médula espinal

La lesión de la médula espinal se debe a la alta susceptibilidad a fracturas vertebrales por la fusión vertebral multinivel y a la presencia osteoporosis. La localización más frecuente de la lesión es a nivel C5-C7. Las consecuencias más graves son los déficits neurológicos, incluida la paraparesia. La mortalidad debidas a este tipo de lesión durante el primer año oscila entre el 6% y el 32% (218).

ii. Subluxación atlantoaxial

Se ha encontrado en series de casos que del 13%-21% de los pacientes con EspAax-r presentan subluxación atlantoaxial, principalmente con subluxación anterior. Aunque puede desarrollarse en las primeras etapas de la EspAax-r, es más común que ocurra en pacientes con enfermedad avanzada y en asociación con la osificación del ligamento longitudinal posterior. Otros factores de riesgo son la artritis periférica y niveles elevados de PCR (219).

iii. Síndrome de cauda equina

Se caracteriza por una pérdida lenta y progresiva de la sensibilidad bilateral de las extremidades inferiores y del perineo, y disfunción del esfínter. Normalmente se produce en pacientes con EspAax-r de larga evolución (220).

1.8.7. Otras condiciones

i. Depresión

En cohortes clínicas, entre el 12% y el 59% de los pacientes informaron de altos niveles de síntomas depresivos en los autocuestionarios (mediana del 30%), siendo el dolor, la limitación funcional, la fatiga, los trastornos del sueño (221) y las preocupaciones relacionadas con la

imagen corporal y la capacidad de trabajo los principales contribuyentes a la presencia de potenciales síntomas depresivos (222).

ii. Dolor crónico generalizado

El dolor crónico generalizado o fibromialgia puede estar presente en el 4%-18% de los hombres y hasta el 50% de las mujeres con EspAax. Su presencia se asocia con peores síntomas, funcionamiento y calidad de vida, y dificultad en el diagnóstico y la evaluación de la actividad de la enfermedad (223) (224).

1.9. Tratamiento

Las recomendaciones ASAS publicadas en 2006 y actualizadas en 2010 y 2016 (225) para el manejo de la EspAax recomiendan un enfoque multidisciplinario y centrado en el paciente, que combina modalidades farmacológicas y no farmacológicas en el manejo las EspAax.

1.9.1. Tratamiento no farmacológico

La educación de los pacientes sobre la enfermedad, el ejercicio regular, el abandono del hábito tabáquico y la fisioterapia se consideran las modalidades no farmacológicas clave en su tratamiento. Su objetivo principal es maximizar la calidad de vida relacionada con la salud, lo que podría lograrse controlando la actividad de la enfermedad, previniendo los daños estructurales y mejorando/manteniendo las funciones físicas y la participación social. (226) (227)

1.9.2. Tratamiento farmacológico no biológico

Las versiones actuales de las principales recomendaciones internacionales basadas en pruebas científicas para el tratamiento de la EspAax (recomendaciones ASAS y EULAR de 2017 y las recomendaciones del American College of Rheumatology (ACR)/SPARTAN de 2016 (228)) son muy parecidas y sólo difieren en algunos puntos relacionados con la interpretación de la bibliografía existente.

i. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs)

Los AINEs siguen siendo la piedra angular del tratamiento farmacológico en la EspAax (228). Actualmente se recomienda el uso de los antagonistas selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), hasta la dosis máxima (tolerada), junto con el ejercicio/fisioterapia continua y la educación de los pacientes. Esta recomendación se basa en la evidencia robusta de que los AINEs son efectivos en la reducción del dolor y la rigidez en pacientes con EspAax-r, y existen datos procedentes de estudios observacionales sobre su efectividad en formas no radiográficas. Además, presentan

efecto en la reducción de la inflamación objetivada en la disminución de niveles de la PCR y en la reducción del EMO en la imagen de RM-SI. No obstante, aún existe controversia sobre su posible efecto reductor de la progresión radiográfica en el tiempo, existiendo estudios a favor y en contra de esta hipótesis. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico que investiga el efecto del celecoxib (inhibidor de la COX-2) en combinación con el tratamiento con anti-TNF.

En cuanto a la seguridad de su uso, datos de estudios observacionales sugieren un efecto protector de la toma de AINEs en estos pacientes en términos de mortalidad general y riesgo CV debido a la reducción de la inflamación sistémica subyacente (51). Aunque un estudio reciente sugiere que no hay diferencias entre el celecoxib, ibuprofeno y naproxeno en lo que respecta a las ECV, un gran estudio de metaanálisis sobre el tratamiento de estos pacientes con diferentes AINEs no mostró diferencias significativas entre los inhibidores selectivos de la COX-2 y los AINEs tradicionales, pero sugirió que el naproxeno puede estar asociado con la reducción del riesgo cardiovascular (229). Los inhibidores selectivos de la COX-2, por otro lado, tienen un mejor perfil de seguridad gastrointestinal, especialmente en pacientes de alto riesgo.

En cuanto al posible papel de los AINEs en la aterosclerosis, el metabolismo del ácido araquidónico está implicado en la fisiopatología de las enfermedades isquémicas CV, y se ha prestado especial atención a la vía catalizada por la ciclooxigenasa, que conduce a la producción de prostanoïdes. El uso de los inhibidores de la COX-2 (COXIBs) ha revelado un aumento de la incidencia de eventos CV, especialmente el infarto de miocardio, ya que el equilibrio entre las isomerasas de prostaglandinas proinflamatorias y anti-inflamatorias parece ser un determinante importante del papel de la COX-2 en la estabilidad de la placa. Algunos estudios realizados en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias han encontrado que el uso a largo plazo de algunos AINEs podría ayudar a disminuir el riesgo CV relacionado con la situación de inflamación persistente en estos pacientes. Se han propuesto varios tratamientos anti-inflamatorios como posibles estrategias terapéuticas para la aterosclerosis al reducir el riesgo vascular general impuesto por la inflamación. Además, el tratamiento del proceso inflamatorio subyacente podría contribuir a mejorar el riesgo CV en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias (230).

ii. Analgésicos

El uso de analgésicos no narcóticos se recomienda en situaciones donde las terapias de primera línea (incluyendo los FAMESb) no han logrado controlar de forma eficaz el dolor o donde se encuentran contraindicadas. Considerando la preocupación por la adicción a los

estupefacientes en la sociedad, el desarrollo de los analgésicos que funcionan a través de mecanismos no narcóticos, será cada vez más importante.

iii. Glucocorticoides

Sólo un ensayo clínico aleatorizado ha investigado el efecto de la prednisolona sistémica en pacientes con EspAax-r. Se observó una mejoría del 50% del BASDAI en el 33% de pacientes tratados con prednisolona oral 50 mg/día durante 2 semanas en comparación con sólo el 8% de respuesta en pacientes tratados con placebo, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, se observó una mejora significativa en el ASDAS (231). Esto podría justificar un tratamiento a corto plazo con glucocorticoides orales como una posible opción de tratamiento en situaciones clínicas especiales, como el tratamiento de un brote agudo de la enfermedad en pacientes con una enfermedad estable o como tratamiento puente hasta que otro tratamiento efectivo pueda iniciarse. Considerando los efectos secundarios de los glucocorticoides a largo plazo y la falta de datos que demuestren un beneficio en la EspAax, el tratamiento con glucocorticoides a largo plazo no se encuentra recomendado.

En relación al tratamiento de las EspAax con glucocorticoides intravenosos, un ensayo abierto y datos observacionales han informado de alguna mejoría clínica en los pacientes (232). Además, el uso de inyecciones locales de corticoesteroides en presencia de las manifestaciones periféricas predominantes (artritis/entesitis) o sacroilitis unilateral aislada se recomienda como una opción terapéutica.

iv. Fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales (FAMEsc)

Las guías de tratamiento se basan en la evidencia de que los FAMEsc, en general, no son eficaces en el tratamiento de la afectación axial de los pacientes con EspA, pero podrían presentar efectos beneficiosos en los pacientes con compromiso de las articulaciones (artritis). En los pacientes con EspAax con artritis periférica concomitante, el tratamiento con sulfasalazina mostró una eficacia moderada (233), mientras que no hubo efecto sobre la entesitis periférica. Tampoco se ha encontrado evidencia de eficacia del metotrexato en el compromiso axial, y muy escasa en la afectación articular periférica y en la entesitis. En cuanto a la leflunomida, no se encuentra indicada para el tratamiento de la afectación axial, pero sí podría tener un papel en el tratamiento de la afectación articular periférica.

v. Fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos dirigidos (FAMEst)

Este grupo incluye las pequeñas moléculas como los inhibidores de las JAK (tofacitinib, baricitib), aún en fase de ensayo clínico pero con resultados esperanzadores (234), upadacitinib

-ya aprobado- (235) y el inhibidor de la fosfodiesterasa-4 apremilast, el cual está indicado actualmente para el tratamiento de la psoriasis y artritis psoriásica (236).

1.9.3. Tratamiento farmacológico biológico

Los FAMESb son proteínas desarrolladas por técnicas biotecnológicas que pueden bloquear las citoquinas inflamatorias a través de diferentes mecanismos. Esto se logra, principalmente, por medio del diseño de anticuerpos monoclonales contra las citoquinas o sus receptores (nombre del fármaco genérico terminado en "-mab"); una forma alternativa es la construcción de una molécula que consiste en un receptor de citoquinas soluble acoplado al fragmento constante (Fc) de una inmunoglobulina (nombre del fármaco genérico terminado en "-cept"); finalmente, existe la posibilidad de diseñar antagonistas de receptores.

i. Inhibidores del TNF (anti-TNF)

En la mayoría de los países existen cinco inhibidores del TNF (anti-TNF) aprobados para el tratamiento de pacientes con EspAax activa. De estos, cuatro son anticuerpos monoclonales dirigidos contra el TNF- α (infliximab, adalimumab, golimumab, y certolizumab) y el quinto, etanercept, es un receptor soluble compuesto del receptor TNF p75 fusionado con la IgG1 humana. Estos tratamientos producen una mejora de los signos y síntomas de la inflamación axial, lo que se asocia con disminuciones significativas en las medidas objetivas de inflamación, como la PCR o las lesiones inflamatorias en la RM-SI y/o la columna vertebral. Además, también presentan eficacia demostrada en el control de las formas periféricas y las manifestaciones extraarticulares de la enfermedad.

Los anti-TNF están indicados en pacientes con una enfermedad axial persistentemente activa (definida como BASDAI ≥ 4 o ASDAS ≥ 2.1), que han fallado a terapia adecuada con AINEs (durante al menos 4 semanas). Para su indicación en pacientes con EspAax-nr, la presencia adicional de medidas objetivas de inflamación (ya sea una PCR elevada o inflamación en la RM-SI) es obligatoria para la aprobación europea.

En cuanto a la progresión radiográfica, debido a la lenta tasa de progresión radiográfica -determinada por la puntuación del mSASSS-, los ensayos clínicos aleatorizados controlados por placebo no se consideran éticos en la EspAax. Además, un estudio realizado en una cohorte histórica no expuesta a FAMESb, la comparación inicial de la progresión radiográfica tras 2 años de terapia con anti-TNF (infliximab, etanercept, y adalimumab) no mostraron una diferencia significativa. Sin embargo, basándose en la asociación entre la actividad de la enfermedad (ASDAS) y los consiguientes daños estructurales, existe actualmente una acumulación circunstancial de evidencias de que los anti-TNF pueden inhibir la formación de sindesmoftos

después de un período de tiempo mayor (≥ 4 años) a través de la supresión mantenida de la actividad inflamatoria (237) (238) (239).

En cuanto a la seguridad, se deben tener en cuenta los factores de riesgo de infección (edad, presencia de comorbilidades y medicación concomitante, entre otros). Un riesgo bien conocido es la reactivación de la tuberculosis latente. Sin embargo, la recomendación de procedimientos para la adecuada prevención de la tuberculosis ha logrado que este problema se haya superado en gran medida (240). Por último, con respecto a las enfermedades malignas, la evidencia actual parece sugerir que no hay un aumento significativo del riesgo de cánceres sólidos y los datos sobre el linfoma también parecen ser tranquilizadores (241).

Es importante buscar factores predictores de respuesta a tratamiento con los anti-TNF, que sean capaces de identificar pacientes que presentarán una respuesta adecuada al tratamiento, sobre todo considerando la carga económica y los potenciales efectos adversos de estas terapias; como la presencia de inflamación basal al inicio del tratamiento (determinada por la elevación de la PCR o la VSG), la presencia de artritis periférica, la existencia de edema óseo en RM-SI, un ASDAS basal elevado, una menor puntuación en el BASFI basal, un BASMI y un Schober reducidos, edad joven, corta duración de la enfermedad, sexo masculino, positividad para HLA-B27. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún biomarcador o conjunto de biomarcadores que ayuden a predecir la respuesta al tratamiento.

ii. Inhibidores de la IL-17

Actualmente existen varios inhibidores de la IL-17 aprobados (secukinumab, ixekizumab) o que están todavía bajo investigación (brodalumab, y bimekizumab). Dada la importancia del eje IL-17/IL-23 en la EspAax, esta vía se ha convertido en una obvia y novedosa diana terapéutica. Secukinumab e ixekizumab se dirigen contra la IL-17A, el bimekizumab contra la IL-17A y la IL-17F, mientras que el brodalumab se dirige al receptor de la IL-17, y por lo tanto inhibe todas las formas de IL-17. La baja tasa de progresión radiográfica observada con el secukinumab es muy alentadora pero requiere estudios controlados a largo plazo antes de obtener conclusiones definitivas sobre el efecto de la terapia anti-IL-17A en la inhibición de la progresión del mSASSS en pacientes con EspAax-r (242).

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La EspAax se caracteriza por la inflamación y la formación de nuevo hueso, características ambas que contribuyen sustancialmente a la carga y al impacto de la enfermedad. La formación de nuevo hueso es una característica importante de la EspAx, ya que puede conducir a la anquilosis de las articulaciones espinales o sacroilíacas, la reducción de la movilidad y el aumento de la discapacidad.

Hasta la fecha, la EspAax es una enfermedad difícil de diagnosticar antes de que se produzca un daño estructural irreversible en la articulación sacroilíaca, y la patogénesis de la enfermedad y sus comorbilidades asociadas aún no se han dilucidado completamente, existiendo lagunas en cuanto a los mecanismos involucrados en el desarrollo y progresión de la misma. Como resultado, el manejo y tratamiento de la EspAax no es completamente satisfactorio. En este sentido se ha observado que el proceso de NETosis juega un papel fundamental en la patogénesis de diferentes enfermedades reumatológicas (i.e. AR o LES). Sin embargo, el proceso de NETosis no se ha investigado en pacientes con EspAax-r.

Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con EspAax es la enfermedad cardiovascular, una enfermedad en la que los factores de riesgo tradicionales clásicos o el estado inflamatorio juegan un papel crucial. No obstante, hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado la contribución de los daños estructurales al aumento del riesgo cardiovascular y la presencia de aterosclerosis subclínica en pacientes con EspAax, independientemente de la edad.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Dado lo anteriormente expuesto, nuestras hipótesis de partida para ambas partes del estudio son las siguientes:

- 1- *Primer estudio.* La desregulación del proceso de NETosis en pacientes con EspAax-r podría ser una de las principales causas que subyace a la patogénesis de la EspAax-r y que esta desregulación podría revertirse con terapia anti-TNF- α .
- 2- *Segundo estudio.* El incremento de riesgo CV estimado en pacientes con EspAax se encuentra asociado con un mayor daño estructural en la columna vertebral.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Aportar nuevas evidencias que ayuden a aclarar el complejo entramado que caracteriza la fisiopatología de las espondiloartritis.

Objetivo principal del primer estudio:

- Evaluar el papel de la NETosis en la patogénesis de la EspAax-r y analizar los efectos beneficiosos de la terapia anti TNF- α sobre este proceso celular.

Objetivos secundarios:

- Analizar la generación espontánea de NETosis en pacientes con EspAax-r en relación a donantes sanos.
- Estudiar la alteración de los componentes de la cascada de transducción de señales que activa el proceso de NETosis.
- Evaluar la relación entre los productos derivados de la NETosis en circulación y los parámetros inflamatorios clínicos.
- Determinar la relevancia de los productos derivados de la NETosis en circulación como potenciales biomarcadores para el pronóstico y monitorización de la enfermedad en pacientes con EspAax-r.
- Evaluar la modulación de la NETosis en pacientes EspAax-r tratados con infliximab, un antagonista del TNF- α , y su efecto sobre el perfil inflamatorio de las células mononucleares de sangre periférica.

Objetivo principal del segundo estudio:

- Evaluar la asociación entre los factores de riesgo de CV estimado y la aterosclerosis subclínica con el daño estructural radiográfico, independientemente de la edad, en un registro de pacientes con EspAax (CASTRO).

Objetivos secundarios

- Analizar el riesgo CV en un registro de pacientes con EspAax de Córdoba (CASTRO).
- Evaluar la asociación entre el riesgo CV medido por el SCORE y el daño estructural en pacientes con EspAax.
- Estimar la relación entre el riesgo CV medido por el SCORE y la ecografía carotídea en pacientes con EspAax.

- Establecer clústers basados en la presencia de placas carotídeas y los niveles de cIMT derecho e izquierdo para definir fenotipos diferentes de pacientes según la prevalencia de factores de riesgo CV y establecer su relación con el daño estructural.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

5. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral hemos desarrollado dos sistemas de reclutamiento de pacientes, de material utilizado y de métodos empleados. Ambos sistemas se han implementado secuencialmente, uno tras otro, intentando dar respuesta a las preguntas de investigación que motivan los trabajos conducentes a esta tesis doctoral:

5.1. Sistema 1: Estudio del papel de la NETosis en la patogénesis de la espondiloartritis axial radiográfica

i. Diseño del estudio y participantes

Los participantes incluidos en el presente estudio fueron seleccionados de la consulta monográfica de EspA del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) tras la previa aprobación por el Comité de Ética e Investigación del Hospital. Para el estudio transversal, diseñado para evaluar la generación espontánea de NETosis y su asociación con parámetros clínicos inflamatorios, se incluyeron 30 pacientes con EspAax-r (25 hombres y 5 mujeres) y 32 donantes sanos relacionados en sexo y edad (22 hombres y 10 mujeres) mientras que para el estudio longitudinal prospectivo, diseñado para evaluar el efecto de la terapia anti-TNF- α sobre el proceso de NETosis, se empleó una cohorte adicional de 15 pacientes con EspAax-r (12 hombres y 3 mujeres) tratados con infliximab durante 6 meses en dosis de 3mg/kg/día por vía intravenosa a los tiempos 0, 2 y 6 semanas, y posteriormente administrado cada 8 semanas. Todos los pacientes incluidos en el presente trabajo cumplían criterios de clasificación para EspAax ASAS (4), los cuales permiten también la inclusión de pacientes con forma clínica establecida de EspAax-r según criterios de Nueva York modificados (6). Así mismo, todos eran mayores de edad (>18 años) y capaces de comprender y completar los cuestionarios autoreportados.

Los criterios de exclusión fueron: embarazo, enfermedades malignas, infecciones crónicas, otras enfermedades reumatológicas inflamatorias, manifestaciones extraarticulares de la EspA (psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, uveítis) e incapacidad para entender los procedimientos del protocolo.

A todos los participantes se les completó la historia clínica, y se les realizó un examen físico y un análisis bioquímico. Los siguientes datos fueron recogidos para el estudio transversal:

- 1) Sociodemográficas: edad, sexo.

- 2) Relacionadas con características de la enfermedad: duración de la enfermedad, presencia o ausencia de antígeno HLA-B27, niveles en plasma de TNF- α y concentración de IL-1 β (pg/mL), y la terapia administrada. La actividad de la enfermedad fue determinada por los niveles de PCR (nmol/L), la VSG (mm/h) y el BASDAI (139). La funcionalidad y la movilidad espinal se determinó mediante los índices BASFI (152) y BASMI (154), respectivamente. El daño estructural fue evaluado mediante la determinación del mSASSS (243).

En el estudio longitudinal, el cuaderno de recogida de datos incluyó los siguientes parámetros clínicos:

- 1) A nivel basal: edad, sexo, duración de la enfermedad, presencia o ausencia de HLA-B27 y la terapia administrada. La actividad de la enfermedad fue determinada por los niveles de PCR (nmol/L), VSG (mm/h), y el BASDAI. La función física de los pacientes con EspAax-r fue evaluada por el BASFI, y el daño estructural se midió con el mSASSS.
- 2) Después de seis meses de tratamiento con infliximab: la actividad de la enfermedad determinada por PCR (nmol/L), VSG (mm/h), y BASDAI y la funcionalidad de los pacientes por el BASFI.

Todos los participantes manifestaron su consentimiento informado por escrito antes de la obtención de la muestra.

El presente estudio siguió los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), el Convenio del Consejo Europeo sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina (1997), la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997), los requisitos establecidos en la legislación española en el área de investigación, de protección de datos de carácter personal y de bioética, en virtud de la Ley 14/2007 (Julio) sobre la Investigación Biomédica. Así mismo, este trabajo se ajustó a lo dispuesto en la Ley 31/1995 (de 8 de noviembre) sobre prevención en materia de salud y seguridad laboral, y los reales decretos relacionados con la exposición a agentes biológicos, y la investigación con células y tejidos humanos.

ii. Obtención de muestras biológicas

Tras 8 horas de ayuno, se procedió a la extracción de muestras de sangre periférica venosa en tubos estériles BD Vacutainer® que contenían 0.129M de citrato trisódico (Becton Dickinson, Meylan, Francia) y tubos Vacuette con activador de coagulación, Z Serum Clot Activator (Vacuette, Madrid, España). Las muestras fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a su extracción. En concreto, el plasma se obtuvo mediante centrifugación a 2000 revoluciones

por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. A continuación, tanto el plasma como el tubo de suero se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Ambos, el suero y el plasma obtenidos, se alicuotaron y conservaron a -80°C hasta su posterior análisis. Diversos marcadores de inflamación (PCR y VSG) y factores genéticos (gen HLA-B27) se evaluaron como parte del manejo rutinario del paciente.

iii. Marcadores inflamatorios en plasma

Los niveles plasmáticos de TNF- α y de IL-1 β fueron examinados usando un ensayo Bio-Plex Pro (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

iv. Purificación de leucocitos

Se aislaron neutrófilos de la sangre de los pacientes y de los controles sanos mediante un protocolo estándar de separación por centrifugación en gradiente de densidad (Dextran, Ficoll-Hypaque). Esta técnica está basada en el mismo método que el Ficoll-Hypaque pero con un paso previo que consiste en la adición de dextrano que hace que los neutrófilos tengan la misma densidad que los leucocitos mononucleados. Se mezcla toda la sangre en un tubo y se añade igual cantidad de dextrano al 3%. Se incubaba a 4°C durante 45 minutos. Tras la incubación se observaron dos fases: una superior con los leucocitos y otra inferior con hematíes. A continuación, se recogen los leucocitos, se les añade Ficoll (proporción 2:1), y se centrifuga a 2500 rpm durante 20 minutos a 20°C (sin aceleración ni deceleración), tras lo cual se realiza una lisis eritrocitaria con solución hipotónica (Figura 5).

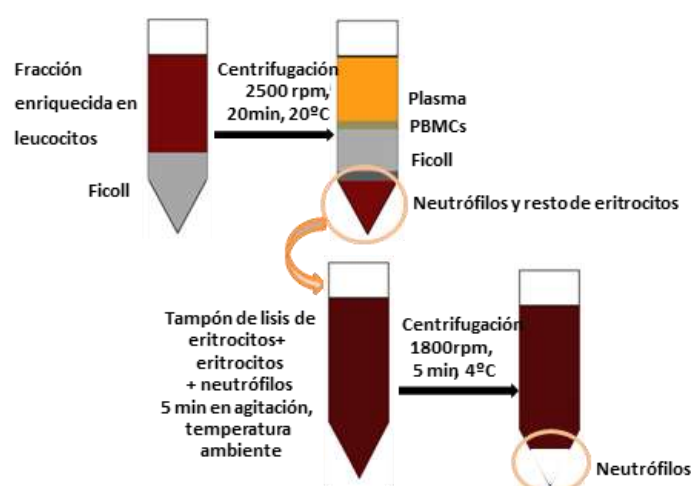


Figura 5. Obtención de neutrófilos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y posterior lisis de eritrocitos con solución hipotónica.

Como los neutrófilos podían ser activados por el método de aislamiento, se evaluó la expresión de CD11b y CD62L en neutrófilos de donantes sanos (n = 5) procedentes de la capa leucoplaquetaria (en inglés buffy coat) obtenida tras la centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (sin aceleración ni deceleración) y tras la sedimentación en dextrano seguido de la centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Ambos marcadores de activación de neutrófilos fueron medidos por citometría de flujo (citómetro FACScalibur de un solo láser, BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) tras el marcaje de los mismos con un anticuerpo anti-CD11b marcado con ficoeritrina (anti-CD11b PE; BD Biosciences) y un anti-CD62L marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC; eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.).

No se halló diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD11b y CD62L entre la capa leucoplaquetaria y el método de aislamiento utilizado en nuestro estudio (Figura 6).

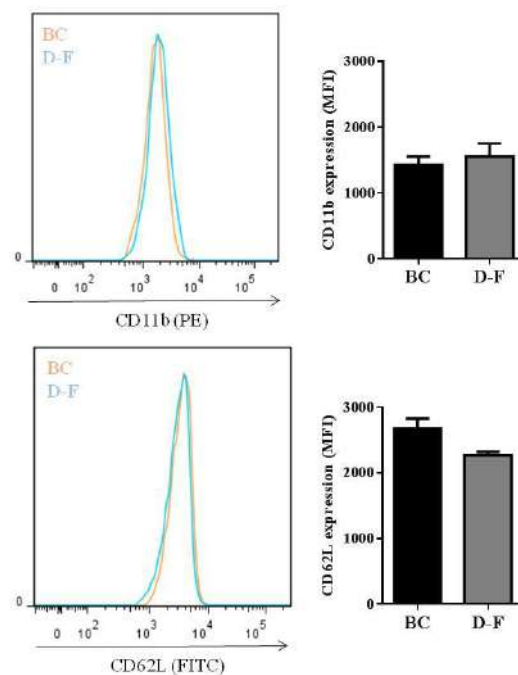


Figura 6. Expresión de CD11b (a) y CD62L (b) en la superficie de los neutrófilos de donantes sanos obtenidos en la capa leucoplaquetaria y de aquellos aislados tras la centrifugación en gradiente de densidad (dextran, Ficoll-Hypaque) (n=5). Los histogramas representativos se muestran en los paneles de la izquierda. Los gráficos de barras (paneles de la derecha) muestran la media \pm SEM de la intensidad media de fluorescencia (MFI). Los datos se analizaron usando una prueba T de Student para muestras relacionadas. BC: capa leucoplaquetaria; D-F, sedimentación de dextrano seguida de la centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque.

Así mismo, se aislaron PBMCs de los donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (StemCell Technology, Oslo, Noruega).

La pureza de las poblaciones (neutrófilos y PBMCS) se evaluó por citometría de flujo (citómetro FACScalibur de un solo láser, BD Biosciences) analizando el tamaño y la complejidad (*forward and side scatters*). La pureza fue $\geq 95\%$ tanto para neutrófilos como para PBMCS.

v. *Generación y cuantificación de NETs*

Neutrófilos aislados de pacientes con EspAax-r ($n = 6$) y donantes sanos ($n = 6$) fueron sembrados en placas de 24 pocillos (6×10^5 células/pocillo) sobre un cubreobjetos de vidrio Corning® BioCoat™ Poly-L-Lysine (Corning, Nueva York, EEUU) e incubadas durante 6 h a 37°C , 5% de CO_2 , para determinar la generación espontánea de NETosis o tratadas con 600 nM del inductor de NETosis PMA (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) durante 2 horas como control positivo. A continuación, los neutrófilos fueron fijados con 4% de paraformaldehído durante 15 minutos y lavadas tres veces con PBS. En primer lugar, las células fueron teñidas con el colorante Sytox orange 5 mM (Life Technologies, Bleiswijk, Holanda) para visualizar el ADN con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti-S (Nikon, Amsterdam, Holanda). Para evaluar la generación de la NETosis, se tomaron un total de cinco imágenes seleccionadas al azar de diferentes regiones de cada cubreobjetos mediante un objetivo de 20x. Las NETs se identificaron manualmente en las imágenes digitalizadas como estructuras Sytox-positivas que derivaban de células que tenían un área dos veces superior a aquellas células basales no marcadas (244) y fueron contadas al menos 3 veces por dos observadores independientes utilizando el software IMAGE-J (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de las NETs (formación de NETs).

En segundo lugar, los neutrófilos fijados fueron incubados con el anticuerpo primario anti-NE humano (1:40) [RbmAb to Neutrophil Elastase (Abcam, Cambridge, Reino Unido)] durante la noche a 4°C , seguido por una incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-Fluor 488 (1:1000) (Abcam) durante 1 hora a 4°C . El ADN nuclear se detectó incubando células marcadas con DAPI 300 nM [del inglés 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU)] durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron colocados en Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc, EEUU) y visualizados mediante el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti-S (NIS-Elements imaging software). Las muestras fueron analizadas y cuantificadas por dos investigadores independientes mediante el programa de procesamiento de imágenes digitales Image J (NIH). La colocalización entre NE y DAPI se estimó por el grado de superposición entre los dos canales fluorescentes. Se consideró que los neutrófilos producían NETs cuando eran positivos para NE y DAPI. Las NETs se calcularon como el promedio de las células teñidas con NE y DAPI (al menos 5 campos al azar de cada

cubreobjetos/muestra [$\times 20$]), normalizados al número total de células. Los resultados se representan como porcentaje de NE/ número total de células.

Para la microscopía electrónica de barrido, los neutrófilos aislados de los pacientes con EspAax-r ($n = 3$) y los donantes sanos ($n = 3$) se fijaron en un tampón de glutaraldehído 2.5% y cacodilato 0.1M (pH 7.2) durante 45 minutos, se lavaron dos veces en el mismo tampón durante 10 minutos/lavado y se deshidrataron en etanol absoluto (serie de 3 lavados de 1 minutos cada uno). El etanol absoluto se cambió 3 veces (10 minutos cada una). A continuación, se eliminó el etanol de las muestras, se incubaron a 35°C durante 20 minutos y se utilizó un High Vacuum Coater Leica EM ACE600 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain) para incluir las células en oro. Las muestras se visualizaron y fotografiaron mediante Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 7800F (Jeol, Tokyo, Japan).

vi. Determinación del ADN extracelular en muestras de sobrenadante

Los neutrófilos aislados de pacientes con EspAax-r ($n = 6$) y donantes sanos ($n = 6$) se sembraron en una placa negra de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) con RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) y se tiñeron con 0.2 μ M del colorante Sytox green (Sytox Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen) durante 6 horas a 37°C en oscuridad. Como control positivo, los neutrófilos se incubaron en presencia de 600 nM de PMA (Sigma-Aldrich) durante 2 horas. Las muestras se midieron mediante fluorimetría (485/535 nm) en el lector de placas Infinite F200® Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia relativas (RFU) menos el fondo como control.

vii. Expresión génica

El ARN total de los neutrófilos y PBMCs se extrajo utilizando TRIsure (Bioline, Taunton, MA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un requisito previo para que las muestras se incluyeran en la RT-qPCR fue que dieran un patrón no degradado de las subunidades 18S y 28S del ARN ribosomal en un gel de agarosa al 1.2%. La pureza del ARN se determinó en cada muestra por medio de relaciones de absorbancia A260/A280, que estuvo entre 1.8 y 2.0. A continuación, la RT-qPCR se realizó en dos pasos. La RT se llevó a cabo utilizando el kit de transcripción inversa QuantiTect® (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, los niveles de expresión de los mediadores inflamatorios se determinaron mediante PCR en tiempo real utilizando un termociclador LightCycler® (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La reacción se llevó a cabo con la mezcla maestra de PCR SYBR® Green (Takara Bio Inc., Madrid, España) según el protocolo del fabricante. Las secuencias de primers o cebadores se enumeran en la Tabla 1. El GAPDH fue seleccionado como gen

constitutivo. Los datos de la PCR en tiempo real fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La expresión de los genes diana se normalizó a la media del gen constitutivo. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los controles, que consistían en una mezcla de reacción sin ADNc, fueron negativos en todas las PCR. La fidelidad de la PCR se determinó mediante el análisis de la temperatura de fusión del ADN.

Primer	Proveedor	Secuencia 5'-3'	
		Forward	Revers
<i>GADPH</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	ACATCGCTCAGACACCATG
<i>STAT-3</i>	IDT, Leuven, Belgium	AGGCATTTGGCATCTGACAG	TGCTTCCTGATTGTGACTG
<i>TNF-α</i>	IDT	TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC	TGCACTTTGGAGTGATCGG
<i>IL-1β</i>	Qiagen, Hiden, Germany	No suministrado por el fabricante	No suministrado por el fabricante
<i>IL-1α</i>	IDT	AGTTCTTAGTGCCGTGAGTTTC	GTGACTGCCAAGATGAAGA
<i>IL-6</i>	IDT	GCCCCACACAGACAGCCACTCACC	TGCCTCTTGCTGCTTTCACACAT
<i>IL-23</i>	IDT	GGCGCAGAGCCAGCCAGATT	ACCCTCAGGCTGCAGGAGTTGG

Tabla 1. Lista de primers. *GADPH*: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; *IL*: interleucina; *STAT*: transductor de señal y activador de la transcripción; *TNF*: factor de necrosis tumoral.

viii. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en neutrófilos

Los biomarcadores de estrés oxidativo se determinaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur de un solo láser (BD Biosciences). Los datos adquiridos se analizaron posteriormente en el software CELL Quest (BD Biosciences), utilizando un dot plot con el tamaño relativo (forward scatter o FSC) y la complejidad interna o granulidad relativa (side scatter o SSC) para la selección y análisis de las diferentes subpoblaciones celulares.

Para la evaluación de la generación de ROS, incluidos los peróxidos y peroxinitritos, las células se incubaron con 20.5 μ M de diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFHDA; Sigma- Aldrich) y 5 μ M de dihidroRodamina-123 (DHRH123; Sigma-Aldrich) durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. Para la detección del glutatión intracelular (GSH), se incubaron células con 1 μ M de 5-clorometilfluoresceína diacetato (CMF-DA; Invitrogen) durante 30 minutos en oscuridad a

37°C. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS y luego se analizaron en un citómetro FACSCalibur de un solo láser (BD Biosciences). El potencial de membrana mitocondria ($\Delta\Psi_m$) se determinó mediante el kit BD MitoScreen (JC-1) (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante.

ix. Determinación de la expresión de elastasa y mieloperoxidasa en neutrófilos

Se incubaron 100 μ L de sangre periférica con 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos (BD Pharm Lyse Lysing Buffer, BD Biosciences, San José, CA, EEUU) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de centrifugar a 1800 rpm, durante 5 minutos a 4°C, las células fueron fijadas y permeabilizadas con 250 μ L de buffer (BDCytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization solution kit with BD Golgi Plug™, BD Biosciences) durante 20 minutos a 4°C y entonces incubadas con el anticuerpo anti-MPO humana conjugado con FITC (BD Biosciences) o con el anticuerpo primario anti-NE humano(1/20) [RbmAb to Neutrophil Elastase (Abcam)], durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, para el análisis de la expresión de NE se añadió un anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 (1:1000) (Abcam) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Los isotipos IgG se utilizaron como controles negativos. Finalmente, tras un lavado celular, se llevó a cabo la adquisición mediante citometría de flujo en el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

x. Extracción de proteínas y análisis mediante Western Blot

La fracción enriquecida en proteínas citosólicas fue aislada mediante el tampón de lisis A, que contenía Hapes (20 mM), KCl (10 mM), EDTA (0.1 mM), EGTA (1 mM), DTT (1 mM), PMSF (0.5 mM), cóctel de inhibidores de proteasas (15 μ L/mL; Sigma-Aldrich-Merck KGaA) and Igepal CA-630 (0.5%; Sigma-Aldrich-Merck KGaA). La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se almacenó (extracto citosólico) a -80°C.

El extracto nuclear se obtuvo incubando el pellet obtenido del extracto citosólico con el tampón de lisis C [Hapes (20 mM), NaCl (0.4 mM), EDTA (1 mM) EGTA (1 mM), DTT (1 mM), PMSF (0.5 mM) y cóctel de inhibidores de proteasas (15 μ L/ml)] durante 15 minutos a 4°C y posterior centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto nuclear) se recogió y se almacenó a -80°C.

La concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU). El análisis de las proteínas se llevó a cabo mediante inmunotransferencia. Para ello, 20 μ g de proteína, tanto citosólica como nuclear, se añadió al tampón de carga Laemmli sample buffer siguiendo las recomendaciones del fabricante (BioRad Laboratories) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles

de poliacrilamida TGX Stain-Free™ (BioRad Laboratories). La electroforesis se realizó con una cámara comercial (Bio-Rad Laboratories) a 120 V y 90 mA. A continuación, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante un trans-blot turbo (Bio-Rad Laboratories). Seguidamente, la membrana se bloqueó en TBS-T (del inglés, *Tris-Buffered Saline*) al 3% de BSA (del inglés, Bovine Serum Albumin) para evitar las uniones inespecíficas y se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios contra las proteínas nucleares y citosólicas correspondientes [anti-Histone citrulinada H3 (dilución 1:1000; Abcam), anti-PAD4 (dilución 1:1000; Abcam), y anti-factor nuclear (NF)- κ B [dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA]], durante toda la noche a 4°C. A continuación, la membrana se lavó tres veces con TBS-T para eliminar el anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG-HRP (dilución 1:7500, Santa Cruz Biotechnology, Madrid, España), durante 1 hora a temperatura ambiente. La tecnología stain-free (Bio-Rad Laboratories) fue utilizada como control de carga de proteínas. Esta tecnología emplea un método patentado del gel de poliacrilamida que permite a las proteínas ser fluorescentes mediante una fotoactivación corta. Los reactivos ECL Advance Detection (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) se utilizaron para detectar la quimioluminiscencia mediante el aparato Molecular Imager®ChemicDoc™ (BioRad Laboratories) con el programa ImageLab™ Software 5.1 (BioRad Laboratories). El análisis densitométrico se llevó a cabo mediante el programa ImageLab™ Software 5.1 (BioRad Laboratories).

xi. Cuantificación de ADN circulante

Se incubaron 10 μ L de plasma de pacientes y donantes sanos con Sytox Green 1 μ M (Sytox Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen) en buffer TBS [del inglés *Tris-buffered saline* (50mM Tris-Cl, pH 7.5 y 150mM NaCl)] a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad. Paralelamente, como control, se utilizó una dilución seriada de ADN de salmón (Sigma-Aldrich-Merck KGaA) como curva de calibración. Las muestras se midieron mediante fluorimetría (485/528 nm) en el fluorímetro Infinity F200® Pro (TECAN, Männedorf, Suiza).

xii. Determinación de elastasa y nucleosomas circulantes

Los nucleosomas fueron medidos usando el kit Human Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, los anticuerpos monoclonales contra el ADN (de cadena doble y simple) y contra las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) se utilizaron para detectar mono- y oligo-nucleosomas en suero de pacientes con EspAax-r y donantes sanos. La elastasa, por su parte, fue medida por el kit PMN Elastase Human ELISA (Abcam) en suero de pacientes con EspAax-r y donates sanos siguiendo las recomendaciones

del fabricante. La cuantificación de los niveles circulantes de nucleosomas y elastasa se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro PowerWave XS Microplate (BioTekInstrument, Winooski, Vermont, EE.UU.).

xiii. Experimentos in vitro

Para evaluar los efectos del infliximab en la generación de NETosis, neutrófilos de donantes sanos ($n = 3$) fueron aislados y pretratados con el reactivo de bloqueo FCRII (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), durante 15 minutos a 4°C. Después, los neutrófilos se lavaron con 2 mL de PBS, se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos, y se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L lisina (BD Biosciences) (6×10^5 células por pocillo) en medio RPMI 1640 con 20% de BSA (PanReacAppliChem, Barcelona, España), 2 mM de L-glutamina (Biowest, Nuaille, Francia) y 1% de ZellShield (Minerva Biolabs, GMBH, Berlín, Alemania)] a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, los neutrófilos se trataron con TNF- α (8 ng/mL; Prepro-Tech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.), un potente inductor de la NETosis, en presencia o en ausencia de infliximab (100 mg/ml; Pfizer, NY, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se evaluó la respuesta NETótica siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Para evaluar los efectos del infliximab en el perfil proinflamatorio promovido por las NETs en células, se sembraron las PBMCs de los tres donantes sanos previos en placas 24 pocillos de baja adherencia (Sigma Aldrich) (1×10^6 células por pocillo) y se trataron durante 24 horas con sobrenadantes obtenidos de los experimentos in vitro descritos anteriormente, los cuales se preincubaron en presencia o ausencia de 15 U/ml de DNase I (NZYTech-Genes & Enzymes, Lisboa, Portugal) durante 10 minutos. Las PBMCs se recogieron para la determinación del perfil inflamatorio mediante RT-qPCR y western blot.

xiv. Análisis estadístico

El programa utilizado para el análisis estadístico fue el SPSS, versión 19.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU). Todos los datos en texto, figuras y tablas se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). El cálculo de la potencia estadística en el estudio transversal mostró que aceptando un riesgo alfa de 0.05 en un contraste bilateral, con 30 sujetos del grupo de EspAax-r y 32 sujetos en el grupo de los donantes sanos, el poder estadístico en los niveles de nucleosomas era del 100% para reconocer una diferencia de medias estadísticamente significativa (1.12 en el grupo de EspAax-r y 0.24 en el grupo de donantes sanos). Para el estudio longitudinal, el cálculo de la potencia estadística indicó que aceptando un riesgo alfa de 0.05 en un test bilateral con 15 sujetos con EspAax-r antes y después de tratamiento, el poder estadístico en la concentración de nucleosomas era del 92% para reconocer como

estadísticamente significativa la diferencia de medias (2.39 en el grupo de EspAax-r antes del tratamiento y 1.04 a los 6 meses de la terapia con infliximab). Aunque se emplearon los nucleosomas para establecer la potencia estadística, debido a que este producto derivado de la NETosis podía ser un biomarcador potencial para la predicción de la actividad de la enfermedad, estábamos igualmente interesados en cambios en el resto de las variables analizadas en este estudio. La potencia estadística en los parámetros restantes fue al menos del 80%.

La distribución normal de las variables para caracterizar diferencias en los parámetros analizados se valoró por el test de Kolmogorov-Smirnow. La comparación entre las variables continuas se realizó utilizando la prueba “T de Student” para muestras independientes y relacionadas cuando la distribución de los datos fue normal o alternativamente una prueba no paramétrica para aquellas muestras que no cumplían las condiciones de normalidad (test de Mann-Whitney, de Wilcoxon o de Kruskal- Wallis H). Las variables cualitativas fueron analizadas usando la prueba Ji cuadrado o la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para excluir la influencia de posibles variables de confusión. Los estudios de correlación entre los diferentes parámetros estudiados se llevaron a cabo con la prueba de correlación lineal de Spearman.

Para distinguir a los pacientes con EspAax-r de los donantes sanos, y para la discriminación de pacientes activos y no activos se utilizaron curvas ROC y el análisis del área bajo la curva (AUC) para determinar la sensibilidad, la especificidad y los valores de corte de cada producto derivado de la NETosis circulante. Los pacientes activos fueron considerados aquellos con un nivel de PCR > 47.62 nmol/L, y/o pacientes con una puntuación del BASDAI ≥ 4 y VSG > 20mm/h (245). Se usó la regresión logística para desarrollar paneles compuestos de biomarcadores y así identificar las firmas que pudieran distinguir a pacientes con EspAax-r de los donantes sanos con una mayor sensibilidad y especificidad. Se calculó el análisis ROC para los paneles compuestos.

Todas las comparaciones fueron bilaterales considerando $p < 0.05$ como un resultado significativo.

5.2. Sistema 2: Estudio de la evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural

i. Diseño del estudio y participantes

Para el análisis de la prevalencia de factores de riesgo CV, y la asociación entre el daño estructural y el riesgo CV estimado en el registro CASTRO (Córdoba Axial Spondyloarthritis Task forcé, Registry and Outcomes), un registro puesto en marcha en 2018 por el grupo de trabajo

de EspA de Córdoba (España), con la intención de recopilar las características de los pacientes con EspA de Córdoba a nivel clínico y básico, se diseñó un estudio observacional transversal que incluyó a 114 pacientes con EspAax procedentes de dicho registro y 132 donantes sanos relacionados en sexo y edad. Los participantes fueron seleccionados de la consulta monográfica de EspA del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) tras la previa aprobación por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Reina Sofía. Todos los pacientes incluidos en el presente trabajo eran mayores de edad (>18 años), cumplían criterios de clasificación para EspA ASAS (4) y fueron capaces de comprender y completar los PROs. Se excluyeron aquellos participantes con antecedentes de evento CV (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica o insuficiencia cardíaca), gestantes, con insuficiencia renal y con enfermedades malignas.

A todos los pacientes incluidos en el registro CASTRO se les realizó una historia clínica completa, un examen físico, y un análisis bioquímico. En un cuaderno de recogida de datos se almacenaron los siguientes datos:

- 1) Variables demográficas: sexo, edad e IMC.
- 2) Variables clínicas: duración de la enfermedad, presencia o ausencia del antígeno HLA-B27, ingesta de AINEs, sacroilitis radiográfica medida por radiografía simple, daño estructural determinado por el mSASSS (243), actividad de la enfermedad medida por PCR, VSG, índice BASDAI (139) e índice ASDAS-PCR (141), manifestaciones extraarticulares (entesis, uveítis, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal) y comorbilidades (osteoporosis, enfermedades pulmonares, genitourinarias, infecciones).
- 3) Factores de riesgo CV: El riesgo CV se determinó utilizando el índice SCORE (181). Se realizó una ecografía de las arterias carótidas por un radiólogo experto con un sistema Philips Epiq-7 y un transductor lineal de banda ancha de 5-14 MHz utilizando el modo B, doppler y a color. Se evaluó y midió la presencia de placas ateroscleróticas cuando estaban presentes. La medición del grosor medio de la íntima media (GIM) de la carótida común distal se evaluó utilizando criterios normalizados de Mannheim, definiéndose la presencia de placa como una estructura focal que invade la luz arterial en al menos 0.5 mm o el 50% del valor del GIM circundante o demuestra un grosor >1.5 mm medido desde la capa media-adventicia hasta la capa íntima-lumen (246) (247).
- 4) El análisis bioquímico incluyó valores séricos de glucosa (mg/dL), insulina (mU/L), colesterol total (mg/dL) y sus diferentes fracciones, triglicéridos (mg/dL), apolipoproteínas A y B (mg/dL), y ácido úrico (mg/dL).

- 5) Daño estructural: Se obtuvieron radiografías de la columna cervical, la columna lumbar y las articulaciones sacroilíacas en el momento de la evaluación del riesgo de CV. Las proyecciones laterales de la columna cervical y lumbar se puntuaron de acuerdo con el mSASSS (243). La sacroilitis se puntuó en las radiografías de la pelvis utilizando los criterios modificados de Nueva York (6). La sacroilitis y el mSASSS fueron puntuados por dos reumatólogos entrenados que fueron cegados a las características del paciente. La puntuación del coeficiente de correlación intraclase (CCI) para el grado de acuerdo entre los dos lectores fue de 0.997 (IC 95% 0.996-0.998) ($p < 0.001$) para el mSASSS total, 0.991 (IC 95% 0.987-0.994) ($p < 0.001$) para el mSASSS cervical y 0.992 (IC 95% 0.989-0.995) ($p < 0.001$) para el mSASSS lumbar. Debido al excelente acuerdo entre ambos lectores, se utilizó la puntuación del lector más experimentado para el análisis.
- 6) Para medir la persistencia de la inflamación, los niveles de PCR (mg/L) se registraron retrospectivamente una, dos o tres veces durante los cinco años anteriores al estudio y en el momento del estudio, por lo que se dispuso de al menos seis determinaciones de los niveles de PCR para cada uno de los pacientes con EspAax. Se consideró que un paciente presentaba inflamación persistente en caso de aumento de los niveles de PCR (> 10 mg/L) en más del 50% de las determinaciones durante los cinco años anteriores, es decir, si cuatro o más de esas seis determinaciones eran elevadas.

Todos los participantes manifestaron su consentimiento informado por escrito antes de la obtención de la muestra.

El presente estudio siguió los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), el Convenio del Consejo Europeo sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina (1997), la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997), los requisitos establecidos en la legislación española en el área de investigación, de protección de datos de carácter personal y de bioética, en virtud de la Ley 14/2007 (Julio) sobre la Investigación Biomédica. Así mismo, este trabajo se ajustó a lo dispuesto en la Ley 31/1995 (de 8 de noviembre) sobre prevención en materia de salud y seguridad laboral, y los reales decretos relacionados con la exposición a agentes biológicos, y la investigación con células y tejidos humanos.

ii. Análisis estadístico

Los datos fueron recogidos y analizados utilizando el software SPSS versión 25.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Se realizó un estudio descriptivo de las variables, calculando las frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y la media aritmética y la desviación estándar para las variables cuantitativas. Se estimó el intervalo de confianza (IC) al 95%. Se comprobó que

las variables seguían una distribución normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron las pruebas paramétricas "T de Student" para muestras independientes y la prueba de Ji-cuadrado para comparar las características demográficas y CV entre los pacientes con EspAax y los donantes sanos, y en los grupos obtenidos en los clústers. Los clústers se realizaron para establecer diferentes fenotipos de los pacientes según el GIM carotídeo y la presencia de placas ateroscleróticas, con el método de *hard clustering*, que se ajustó según la edad. Se obtuvieron dos grupos o clústers de pacientes que presentaban diferencias en cuanto a la presencia de placas y al GIM carotídeo, y se compararon la prevalencia de factores de riesgo CV y de características relacionadas con el daño estructural entre los dos grupos obtenidos.

La relación lineal entre las variables se midió mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson en todos los grupos y luego en grupos obtenidos a partir de la mediana de edad para comprobar que las relaciones se mantenían independientemente de la edad. Dado que la edad, la duración de la enfermedad, el estatus de fumador, la PCR y la ingesta de AINEs son variables biológicamente asociadas tanto con el daño estructural como con el riesgo CV, en los pacientes con EspAax, se realizó un Modelo Lineal Generalizado (MLG) para determinar la asociación entre el mSASSS y el SCORE, así como con la presencia de placas de ateroma mediante el ajuste por estas variables. Para la asociación entre el mSASSS y el SCORE, se utilizó un MLG gaussiano (GLM) ya que la variable dependiente no era normal. Para la asociación entre el mSASSS y la presencia de placas ateroscleróticas, se utilizó una regresión logística ya que la variable dependiente era binaria (sí/no). Todas las comparaciones fueron bilaterales considerando $p < 0.05$ como un resultado significativo.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Estudio de la NETosis

6.1.1. Población de estudio

En la Tabla 2 se resumen las características clínicas y de laboratorio de los pacientes con EspAax-r (25 hombres y 5 mujeres) y de donantes sanos (22 hombres y 10 mujeres) incluidos en el estudio transversal.

	Pacientes EspAax-r (n=30)	Donantes sanos (n=32)	p
Parámetros clínicos			
Mujeres/Hombres	5 (25)	10 (22)	0.180
Edad (años)	46.40±2.45	41.06±1.77	0.080
BASDAI	4.42±0.45	...	
BASFI	4.73±0.61	...	
BASMI	3.22±0.31	...	
mSASSS	19.16±3.86	...	
Duración de la enfermedad (años)	13.23±2.07	...	
Manifestaciones extraarticulares			
- Uveítis	0	0	
- Psoriasis	0	0	
- EII	0	0	
Parámetros de laboratorio			
HLA-B27 (%)	26 (86.67)	...	
PCR [†] , nmol/L	122.57±31.38	13.62±3.25	<0.001*
VSG [†] , mm/h	19.84±4.09	7.48±1.00	0.006*
TNF-α, pg/mL	10.89±1.82	4.02±1.20	0.021*
IL-1β, pg/mL	2.46±0.22	1.57±0.27	0.047*
Tratamientos			
AINEs (%)	28 (93.33)	...	
Sulfasalazina (%)	2 (6.67)	...	

Tabla 2. Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con EspAax-r y de los donantes sanos. Los valores se presentan como media ± SEM. Los datos fueron analizados usando la prueba T para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney para evaluar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes EspAax-r y los donantes sanos. †Datos que no siguen una distribución normal. EspAax-r: Espondiloartritis axial radiográfica; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASMI: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; PCR: Proteína C Reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; AINEs: Anti-inflamatorios no esteroideos. *Diferencias estadísticamente significativas.

Pacientes y donantes sanos presentaban una edad media similar, que se encontraba en torno a 46.4 ± 2.4 años y 41.1 ± 1.8 años, respectivamente. Los pacientes con EspAax-r incluidos en este trabajo mostraban una duración de la enfermedad media de 13.2 ± 2.1 años, exhibiendo el 100 % de los mismos daños estructural, con un mSASSS de 19.2 ± 3.9 . En cuanto a la actividad de la enfermedad, el BASDAI fue de 4.4 ± 0.4 , y los niveles de PCR, VSG y citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) fueron significativamente más elevados que en los donantes sanos ($p < 0.05$). El 86.7% fueron positivos para el antígeno HLA-B27 y ningún paciente presentaba en el momento de la evaluación uveítis anterior, enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis, aunque cuatro de ellos habían presentado uveítis anterior en el pasado. Respecto al tratamiento, un 93.3% estaban tomando AINEs y un 6.7% el FAME sulfasalazina.

6.1.2. Incremento de la generación de NETosis en los pacientes con EspAax-r

En comparación con los donantes sanos, los neutrófilos derivados de los pacientes con EspAax-r mostraron un aumento espontáneo de la NETosis, tal y como se observó mediante la microscopía de fluorescencia, fluorimetría y microscopía electrónica de barrido (Figura 7a-d).

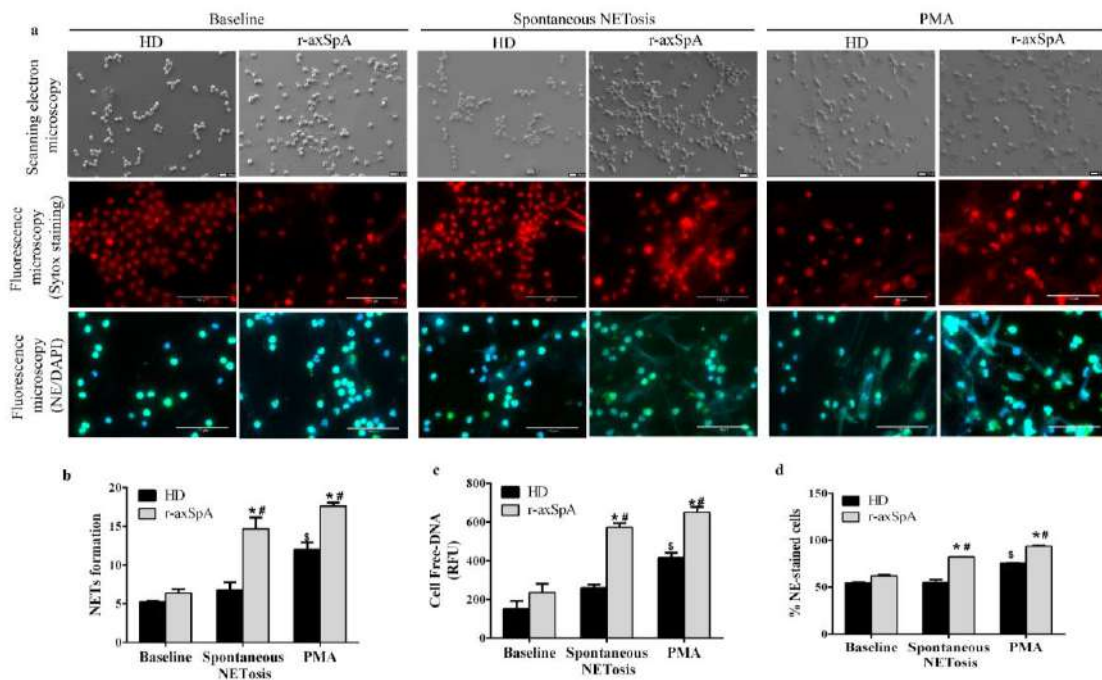


Figura 7. Generación de NETosis aumentada en los neutrófilos de los pacientes EspAax-r. a-d) Los neutrófilos aislados de pacientes y donantes sanos fueron incubados ex vivo durante 6 horas para determinar la NETosis espontánea o tratados con o sin PMA (600 nM) durante 2 horas (control positivo). a) En los paneles superiores se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido representativas de la formación de NETs en pacientes (n=3) y donantes sanos (HDs; n=3). Barra de escala: 10 μ m. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las NETs de los pacientes (n=6) y HDs (n=6) teñidos con Sytox o con el anticuerpo anti-NE y DAPI se representan en los paneles centrales e inferiores, respectivamente. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 20x. Barra de escala: 100 μ m. b) Formación de NE. Los resultados se expresaron como porcentaje de NET. c) Niveles de ADN extracelular. Los datos se representan como unidades de fluorescencia relativa (RFU). d) Porcentaje de células teñidas con NE. (b-d) Los gráficos de barras muestran la media \pm SEM (HDs, n=6; pacientes, n=6). Los datos se analizaron usando una prueba T de muestras independientes o una prueba T de muestras relacionadas. *vs. HDs; #, vs. niveles basales ($p < 0.05$). NETs, redes extracelulares de neutrófilos; NE, elastasa de neutrófilos; r-axSpA, espondiloartritis axial radiográfica.

Así, el análisis de las fibras de ADN teñidas con SYTOX y de los niveles de ADN extracelular revelaron que los neutrófilos de los pacientes generaron NETs a una magnitud mayor que aquellos procedentes de los controles tras 6 horas de incubación *ex vivo* ($p < 0.05$; Figura 7a-c). En consecuencia, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de fibras de ADN y de ADN extracelular entre ambos grupos a las 6 horas ($p < 0.05$; Figura 7a-c). El aumento de la producción espontánea de NETs en esta patología es corroborado, adicionalmente, por la observación de un aumentado porcentaje de células teñidas con NE a las 6 horas, según se visualizó por microscopía de fluorescencia ($p < 0.05$; Figura 7a y d). El PMA, fuerte inductor de NETosis, se utilizó como control positivo (Figura 7a-d).

6.1.3. Expresión aumentada de componentes de señalización asociados a las NETs, translocación de PAD4 al núcleo, y el aumento de citrulinación de la histona H3 en los neutrófilos de pacientes con EspAax-r

A continuación, estudiamos los elementos de señalización y los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de la NETosis (102) (105) (104) (248). Observamos que los neutrófilos procedentes de los pacientes con EspAax-r presentaban un aumento de la expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), del TNF- α , la IL-1 β , la IL-1 α y de la IL-6, así como una mayor producción de peroxinitritos, una disminución de los niveles totales de GSH y un incremento del porcentaje de células con alteración del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en comparación con aquellos de los donantes sanos ($p < 0.05$; Figura 8a y b). Así mismo, se encontraron niveles intracelulares aumentados de NE y MPO en los neutrófilos derivados de los pacientes con EspAax-r en comparación con los donantes sanos ($p < 0.05$; Figura 8c).

La citrulinación de las subunidades de histonas, como la H3, por el PAD4 promueve la descondensación de la cromatina (249). Dado que la translocación de PAD4 al núcleo es necesaria para que ejerza su función, a continuación exploramos la localización de PAD4 (nuclear o citoplasmática) y se observó que a diferencia de los donantes sanos, esta enzima se ubicaba preferentemente en el núcleo de los neutrófilos de los pacientes ($p < 0.05$; Figura 8d). La presencia nuclear de PAD4 se asoció con niveles incrementados de CitH3 en los neutrófilos de pacientes con EspAax-r vs. donantes sanos ($p = 0.016$; Figura 8e).

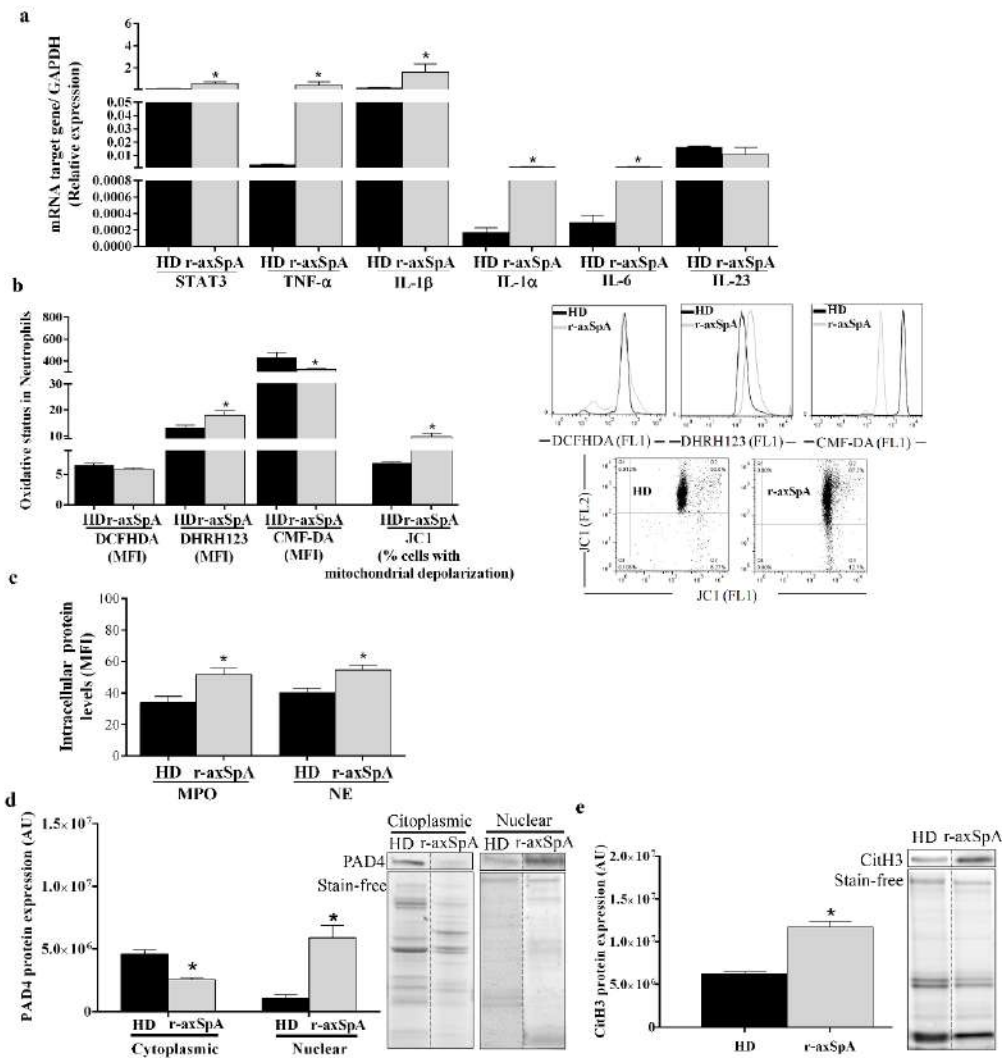


Figura 8. Los neutrófilos de los pacientes con EspAax-r muestran alteración en las vías de transducción de señales relacionadas con la NETosis. a) Niveles de expresión relativa de los genes inflamatorios. b) Producción de peróxido y peroxinitrito (DCFHDA y DHRH123), niveles de glutatión intracelular (CMF-DA) y porcentaje de células con despolarización mitocondrial. Los gráficos de barras muestran MFI para los niveles de peróxido, peroxinitrito y glutatión. En los paneles de la derecha se muestran histogramas y dot plots representativos. c) Expresiones intracelulares de las proteínas MPO y NE. Los gráficos de barras muestran la MFI. d) Expresión relativa de las proteínas PAD4 y CitH3. Se muestran blots representativos. Las líneas discontinuas de los gels indican que las muestras fueron cargadas en el mismo gel pero que no estaban contiguas. (a-d) Los valores se presentan como media \pm SEM (HDs, n=32; pacientes EspAax-r, n=30). Los datos se analizaron usando una prueba T de muestras independientes o una prueba de U de Mann-Whitney. *vs. HDs (p<0.05). AU, unidades arbitrarias; CitH3, histona citrulinada H3; HDs, donantes sanos; IL, interleucina; MFI, intensidad media de fluorescencia; MPO, mieloperoxidasa; NE, elastasa del neutrófilo; PAD4, peptidilarginina deaminasa 4; r-axSpA, espondiloartritis axial radiográfica; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción; TNF, factor de necrosis tumoral.

6.1.4. Los pacientes con EspAax-r muestran niveles circulatorios alterados de productos derivados de la NETosis

Los niveles de ADN extracelular se encontraron significativamente más elevados en el plasma de los pacientes con EspAax-r que en el de donantes sanos (p =0.007; Figura 9a). En paralelo, se observó que las concentraciones extracelulares de nucleosomas y elastasa también se hallaban significativamente elevadas en el suero de pacientes con EspAax-r respecto a los donantes sanos (p <0.05; Figura 9a).

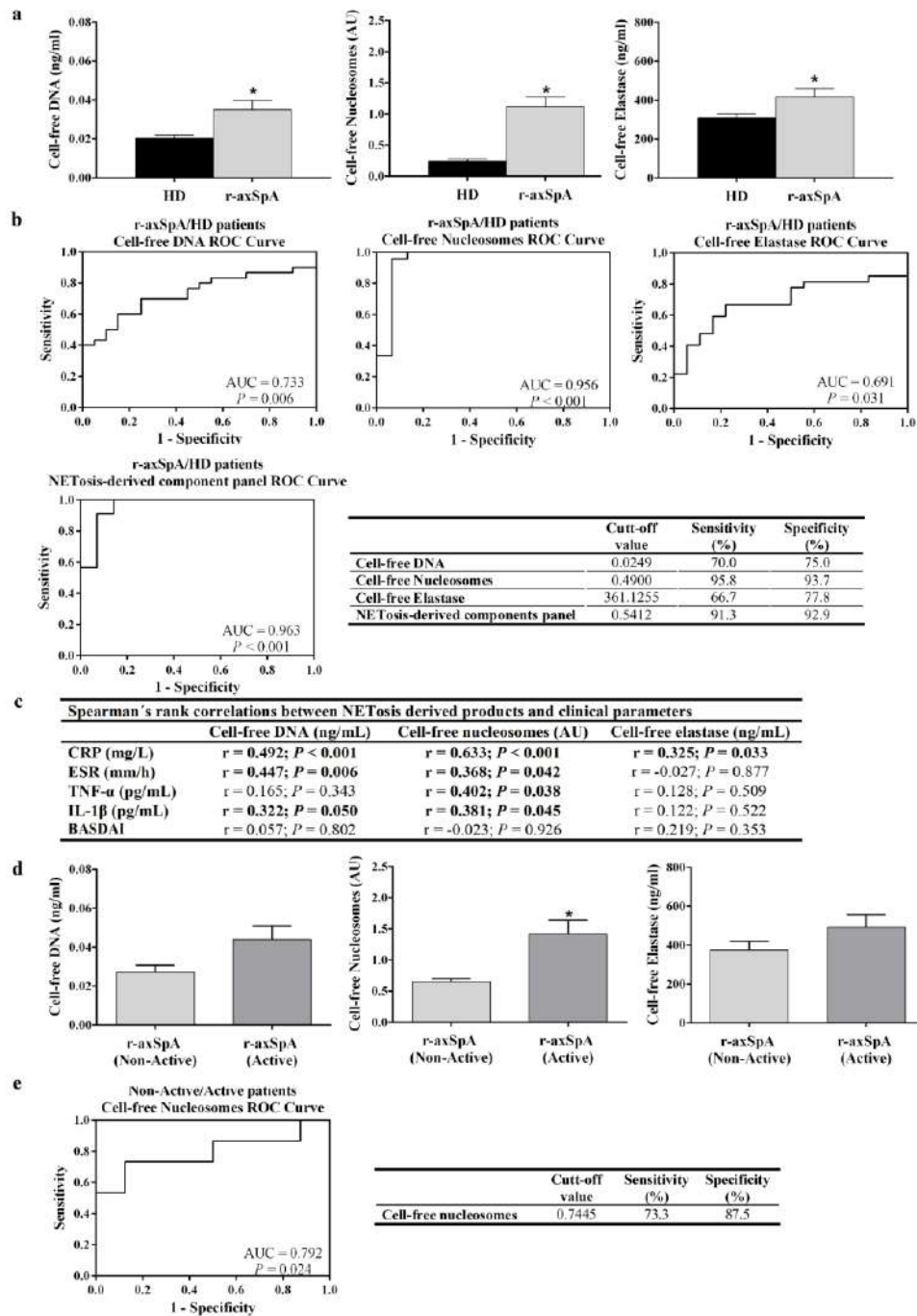


Figura 9. Los niveles circulantes de los productos derivados de la NETosis incrementan en los pacientes con EspAax-r y son biomarcadores asociados a la EspAax-r y a la actividad de la enfermedad. a) Niveles circulantes de los productos derivados de la NETosis. Los valores se representan como media \pm SEM (HDs, n=32; pacientes EspAax-r, n=30). Los datos se analizaron mediante la prueba T para muestras independientes. *vs. HDs ($p < 0.05$). b) Se realizaron análisis de las curvas ROC de los productos derivados de la NETosis y una combinación de éstos como panel para evaluar su potencial como biomarcadores asociados a EspAax-r. Se testó el valor de corte con mayor especificidad y sensibilidad. c) Correlaciones de Spearman entre los productos derivados de la NETosis y los parámetros inflamatorios clínicos. d) Niveles circulantes de productos derivados de la NETosis extracelulares en pacientes activos (n=18) y no activos con EspAax-r (n=12). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante una prueba T para muestras independientes. *vs. HDs ($p < 0.05$). e) Se realizó un análisis de la curva ROC de los nucleosomas libres de células circulantes para evaluar su potencial como biomarcadores de la actividad de la enfermedad en EspAax-r. Se testó el valor de corte con mayor especificidad y sensibilidad. AU: unidades arbitrarias; AUC: área bajo la curva; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; CRP: proteína C reactiva; ESR: velocidad de sedimentación globular; HD: donantes sanos; IL: interleucina; r-axSpA: espondiloartritis axial radiográfica; TNF: factor de necrosis tumoral.

A continuación, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para determinar la asociación de estos productos derivados de la NETosis con la edad, el sexo y el diagnóstico (EspAax-r vs. donantes sanos). Se demostró estadísticamente que únicamente el diagnóstico actuaba como una variable asociada con las concentraciones de ADN, nucleosomas y elastasa extracelulares (Tabla 3). Así mismo, los pacientes con EspAax-r se agruparon en tres grupos según la duración de la enfermedad (≤ 10 años, 11-20 años, > 20 años) con el fin de evaluar la asociación de este factor con los niveles circulantes de estos marcadores de NETosis extracelulares. Las comparaciones entre grupos demostraron que no había diferencias estadísticamente significativas en la concentración de estos productos (Tabla 4).

	Variables independientes	B	P	Intervalo de confianza al 95% para B	
				Límite superior	Límite inferior
ADN extracelular	Modelo 1				
	Edad	0.000	0.484	-0.001	0.000
	Sexo	0.006	0.428	-0.009	0.020
	Diagnóstico	0.017	0.013*	0.004	0.030
	Modelo 2				
	Sexo	0.006	0.439	-0.009	0.020
Nucleosomas extracelulares	Diagnóstico	0.016	0.016*	0.003	0.028
	Modelo 3				
	Diagnóstico	0.015	0.021*	0.002	0.027
	Modelo 1				
	Edad	0.001	0.932	-0.018	0.019
	Sexo	0.266	0.299	-0.246	0.777
Elastasa extracelular	Diagnóstico	0.942	<0.001*	0.582	1.402
	Modelo 2				
	Sexo	0.265	0.293	-0.239	0.770
	Diagnóstico	0.945	<0.001*	0.500	1.391
	Modelo 3				
	Diagnóstico	0.890	<0.001*	0.456	1.323
Panel de productos derivados de la NETosis	Modelo 1				
	Edad	-0.793	0.750	-5.777	4.191
	Sexo	-36.359	0.598	-174.629	101.910
	Diagnóstico	142.286	0.030*	14.444	270.129
	Modelo 2				
	Sexo	-36.421	0.594	-173.107	100.265
Panel de productos derivados de la NETosis	Diagnóstico	137.884	0.029*	14.501	261.266
	Modelo 3				
	Diagnóstico	145.303	0.018*	26.183	264.423
	Modelo 1				
	Edad	-0.001	0.840	-0.007	0.006
	Sexo	0.008	0.929	-0.171	0.186
Panel de productos derivados de la NETosis	Diagnóstico	0.688	<0.001*	0.523	0.854
	Modelo 2				
	Edad	-0.001	0.836	-0.007	0.006
	Diagnóstico	0.686	<0.001*	0.529	0.844
	Modelo 3				
	Diagnóstico	0.683	<0.001*	0.531	0.836

Tabla 3. Análisis de regresión lineal múltiple con las variables potenciales asociadas con los productos derivados de la NETosis.

	<10 años (n=14)	11-20 años (n=10)	>20 años (n=6)	p
ADN extracelular	0.032±0.008	0.037±0.009	0.040±0.013	0.618
Nucleosomas extracelulares	1.070±0.142	0.991±0.282	0.740±0.120	0.448
Elastasa extracelular	434.5±72.80	428.2±97.18	407.9±58.34	0.861
Panel de productos derivados de la NETosis	0.868±0.061	0.830±0.081	0.929±0.035	0.677

*Tabla 4. Análisis comparativo entre los grupos de pacientes con EspAax-r según la duración de la enfermedad. Los valores se expresan como media ± SEM. Los datos se analizaron utilizando la prueba H de Kruskal-Wallis para buscar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes con EspAax-r según la duración de la enfermedad. *Diferencias estadísticamente significativas.*

Para estudiar la relevancia de los productos derivados de la NETosis en circulación como potenciales biomarcadores de la enfermedad en pacientes con EspAax-r, se llevó a cabo el análisis de las curvas ROC. Como se muestra en la Figura 9b, los niveles circulantes de ADN, nucleosomas y elastasa pudieron distinguir con precisión a los pacientes EspAax-r de los donantes sanos, con el AUC variando desde 0.691 a 0.956. Para explorar más a fondo la precisión de estos componentes circulantes para discriminar a los pacientes con EspAax-r de los donantes sanos, se realizó una combinación de los tres productos como un panel utilizando una regresión logística en el conjunto de datos. A continuación, y tras un análisis multivariante, se demostró que únicamente el diagnóstico (ni el sexo, ni la edad) actuaba como una variable asociada con los niveles de la firma de los tres productos en pacientes con EspAax-r vs. donantes sanos (Tabla 3). Además, el análisis comparativo entre los grupos estratificados por duración de la enfermedad también demostró la presencia de diferencias no significativas en los niveles del panel de componentes derivados de la NETosis (Tabla 4). La combinación de estos marcadores de NETosis como un panel mostró un valor de AUC de la curva ROC de 0.963 ($p < 0.001$). Seleccionando un punto de corte (0.541) con una especificidad del 92.9%, el panel alcanzó una sensibilidad del 91.3% para detectar pacientes EspAax de donantes sanos (Figura 9b). Por lo tanto, los productos derivados de la NETosis pueden ser biomarcadores adecuados para la discriminación entre los pacientes con EspAax-r y los donantes sanos.

6.1.5. Los niveles circulantes de marcadores de NETosis extracelulares se asocian a parámetros inflamatorios clínicos

A continuación, estudiamos la correlación entre los productos derivados de la NETosis circulantes y los parámetros de inflamación clínica (Figura 9c). Los niveles en circulación de ADN y nucleosomas extracelulares correlacionaron positivamente con la PCR, la VSG y las concentraciones de IL-1 β . Además, los niveles de nucleosomas también se asociaron positivamente con la concentración de TNF- α , y los niveles circulantes de elastasa extracelular

con la concentración de PCR. Sin embargo, no se observó una correlación estadísticamente significativa entre el BASDAI y los productos derivados de la NETosis.

6.1.6. Utilidad de los nucleosomas extracelulares en circulación como biomarcadores para la actividad de la enfermedad en los pacientes con EspAax-r

Para explorar, más a fondo, la posible utilidad de los productos derivados de la NETosis circulantes como biomarcadores de la actividad de la enfermedad, analizamos la asociación de estos componentes de las NETs con la actividad clínica de los pacientes con EspAax-r. Los pacientes fueron divididos en dos subgrupos basados en los niveles de PCR y VSG, y la puntuación del BASDAI. Los pacientes con un nivel de PCR > 47.62 nmol/L y/o pacientes con una puntuación del BASDAI \geq 4 y VSG > 20 mm/h fueron considerados como pacientes activos (n = 18), mientras que los restantes fueron clasificados como pacientes no activos (n = 12) (245). Hallamos que los niveles de nucleosomas extracelulares aumentaron significativamente en los pacientes con EspAax-r activos vs. no activos ($p = 0.007$; Figura 9d). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros analizados.

Para estudiar si los niveles de nucleosomas extracelulares pueden ser usados como biomarcadores potenciales de la actividad de la enfermedad en pacientes con EspAax-r, se realizaron análisis de curvas ROC. Este análisis reveló que los nucleosomas pudieron distinguir con precisión evidente a los pacientes activos de los no activos, con un AUC de 0.792 ($p = 0.024$; sensibilidad = 73.3%, especificidad = 87.5%, valor de corte = 0.744) (Figura 9e). En consecuencia, nuestros resultados sugieren que los niveles circulantes de nucleosomas extracelulares presentan un gran potencial como biomarcadores para la discriminación de los pacientes en función de la actividad de la enfermedad.

6.1.7. La terapia anti-TNF- α reduce la generación de NETosis en pacientes con EspAax-r

Para explorar el efecto de la terapia anti-TNF- α en los niveles de expresión de componentes circulantes de la NETosis, una nueva cohorte de 15 pacientes con EspAax-r se incluyó en un estudio longitudinal a 6 meses (Tabla 5). Después de la terapia con infliximab, los niveles de PCR y VSG, y la puntuación del BASDAI y BASFI mejoró significativamente ($p < 0.05$; Figura 10a). En paralelo, los pacientes con EspAax-r mostraron una reducción en los niveles circulantes de ADN, nucleosomas y elastasa extracelulares tras seis meses de tratamiento con infliximab ($p < 0.05$; Figura 10b). En consecuencia, los neutrófilos presentaron una menor expresión de PAD4 en el

compartimento nuclear, junto con una disminución de la concentración de citH3 después del tratamiento ($p < 0.05$; Figura 10c y d).

Pacientes EspAax-r (n=15)	
Parámetros clínicos	
Mujeres/hombres	2/13
Edad (años)	40.75±2.41
BASDAI	5.98±0.85
BASFI	4.82±0.87
mSASSS	14.87±6.39
Duración de la enfermedad (años)	11.87±2.25
Manifestaciones extraarticulares	
- Uveítis	0/15
- Psoriasis	0/15
- EII	0/15
Parámetros de laboratorio	
HLA-B27 (%)	15/15 (100%)
PCR (nmol/L)	79.71±11.14
VSG (mm/h)	17.85±2.76
Tratamientos	
AINEs (%)	15/15 (100%)
Metotrexate	2/15 (13.33 %)
Sulfasalazina (%)	4/15 (26.67%)

Tabla 5. Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con EspAax-r incluidos en el análisis longitudinal. Los valores se presentan como media ± SEM. BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index; PCR: Proteína C Reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal; mSASSS, modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos; EspAax-r: espondiloartritis axial radiográfica.

El estudio *in vitro* mostró que la NETosis promovida por el TNF- α se previno con infliximab, como se demuestra por la reducción de la extrusión de fibras de ADN, niveles de ADN extracelular, y el porcentaje de neutrófilos teñidos con NE ($p < 0.05$; Figura 10e-h).

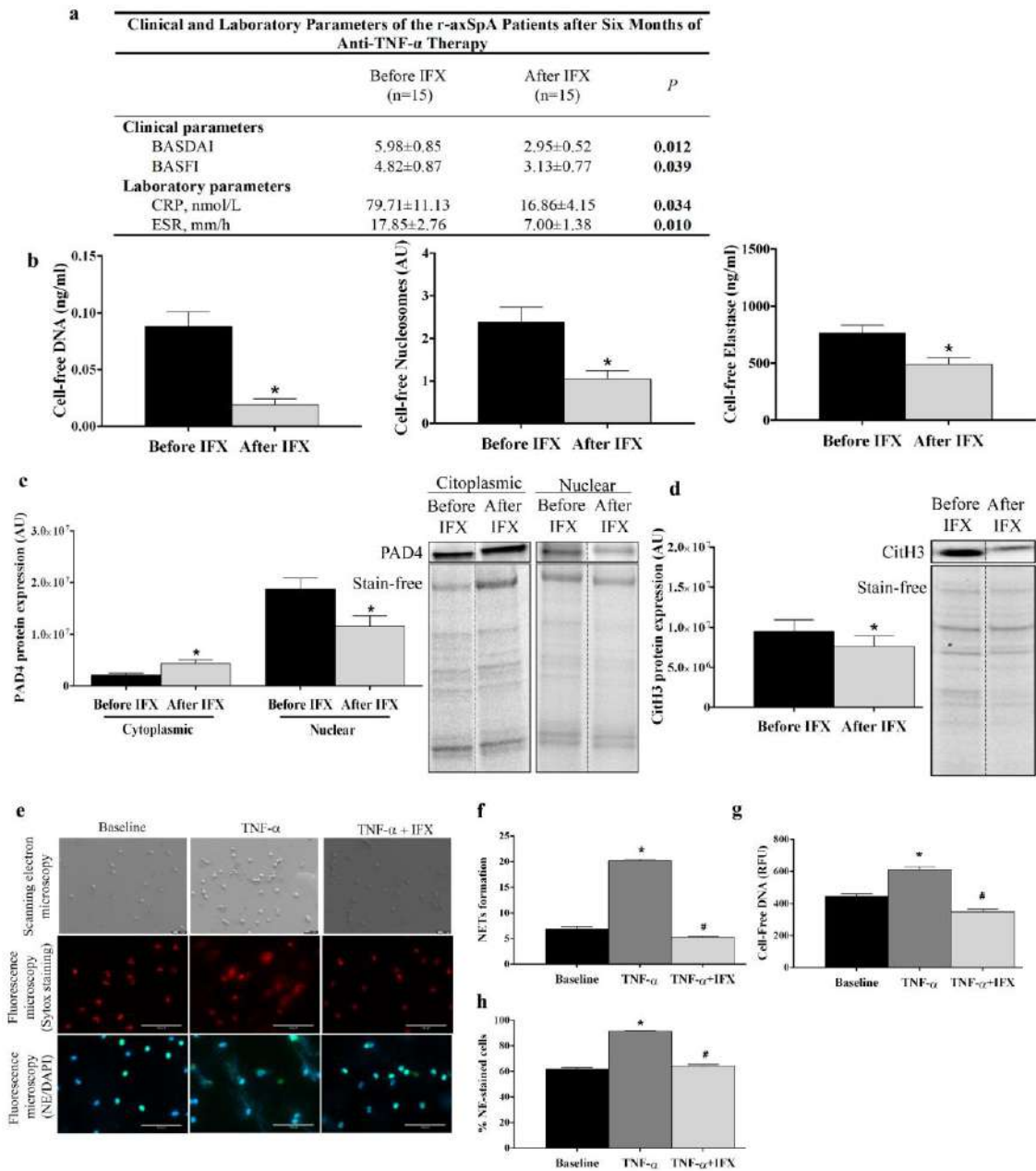


Figura 10. La terapia anti-TNF- α disminuye la NETosis. *a)* Parámetros clínicos y de laboratorio, y *b)* niveles circulantes de productos derivados de la NETosis extracelulares a nivel basal y después de 6 meses de terapia con infliximab. *c-d)* Expresión relativa de las proteínas PAD4 y CitH3 a nivel basal y después de la terapia con infliximab. Se muestran blots representativos. Las líneas discontinuas de los geles indican que las muestras fueron cargadas en el mismo gel pero que no estaban contiguas. *(e-h)* Para evaluar el efecto de infliximab en la formación de NETs, neutrófilos de los HDs ($n=3$) fueron tratados con TNF- α (8ng/mL) en presencia o ausencia de infliximab (100mg/ml) durante 2 horas. *e)* En los paneles superiores se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido representativas de la formación de las NETs. Barra de escala: 10 μ m. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las NETs teñidos con Sytox o con el anticuerpo anti-NE y DAPI se representan en los paneles centrales e inferiores, respectivamente. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 20x. Barra de escala: 100 μ m. *f)* Formación de NET. Los resultados se expresaron como porcentaje de las NETs. *g)* Niveles de ADN extracelular en sobrenadante. Los datos se representan como unidades de fluorescencia relativa (RFU). *h)* Porcentaje de células teñidas para NE. *(a-h)* Los gráficos de barras muestran la media \pm SEM. Los datos se analizaron usando la prueba T para muestras relacionadas. *vs. nivel basal, #vs. TNF- α ($p<0.05$). AU: unidades arbitrarias; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index; CitH3: histona citrulinada H3; CRP: proteína C reactiva; ESR: velocidad de sedimentación globular; HD, donante sano; NE: elastasa de neutrófilo; NETs: redes extracelulares de neutrófilos; PAD4: peptidilarginina deaminasa 4; r-axSpA: espondiloartritis axial radiográfica; TNF: factor de necrosis tumoral.

6.1.8. La inhibición de la liberación de NETs por el tratamiento *in vitro* con infliximab modula el perfil inflamatorio en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

La prevención de la generación de la NETosis por el tratamiento combinado de los neutrófilos con TNF- α más infliximab promovió la normalización de la actividad inflamatoria en las PBMCs. Así, mientras los neutrófilos de los donantes sanos tratados con TNF- α indujeron una translocación de NF- κ B al núcleo ($p = 0.05$; Figura 11a) y la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios ($p < 0.05$; Figura 11b) en las PBMCs en comparación con la situación basal, el tratamiento combinado con infliximab redujo significativamente esos efectos ($p < 0.05$; Figura 11).

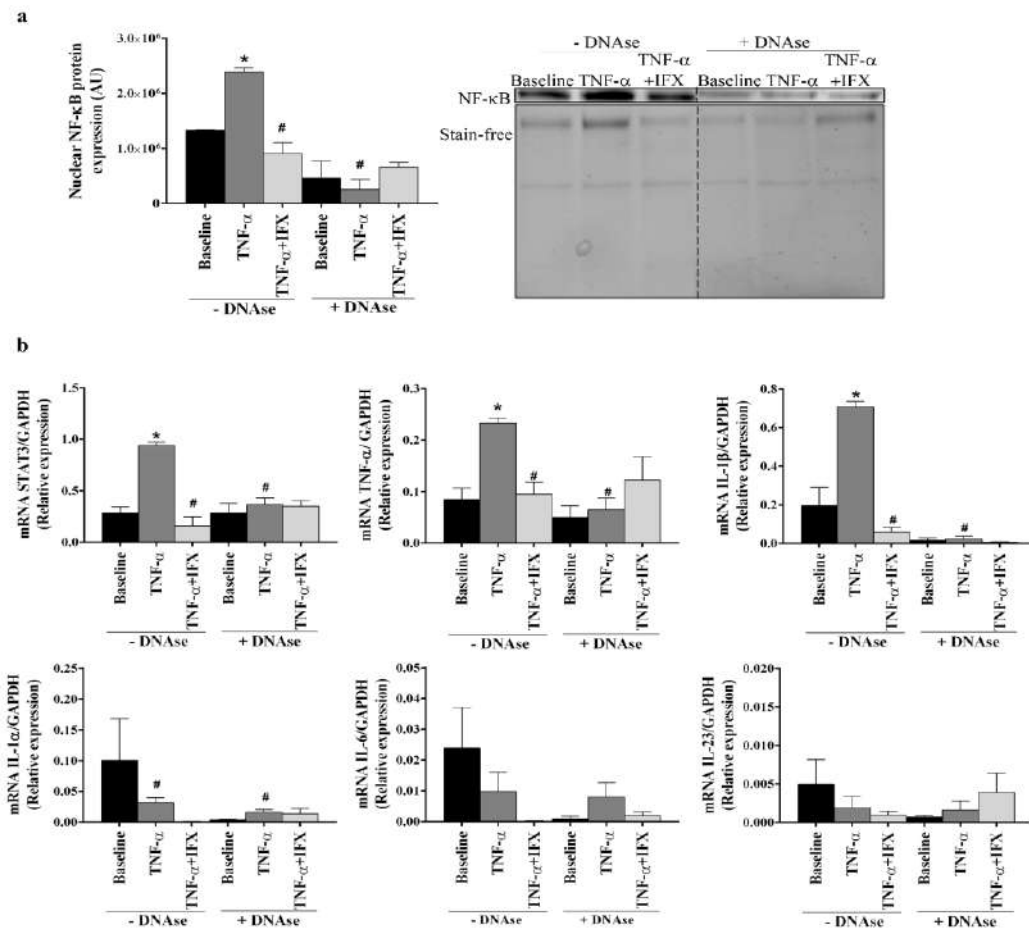


Figura 11. La inhibición de la extrusión de NETs por el tratamiento *in vitro* con infliximab reduce la actividad inflamatoria de las células mononucleares. Para estudiar los efectos del infliximab en el perfil inflamatorio de las PBMCs promovido por las NETs, los neutrófilos de los controles sanos ($n=3$) fueron tratados con TNF- α (8 ng/mL) en presencia o en ausencia de infliximab (100 mg/ml) durante 2 horas. Después, los sobrenadantes, que fueron preincubados en presencia o ausencia de 15 U/ml de ADNase I durante 10 minutos, se agregaron a las PBMCs y se incubaron nuevamente durante 24 horas. a) Expresión de la proteína NF- κ B nuclear. Se muestran blots representativos. Las líneas discontinuas de los geles indican que las muestras fueron cargadas en el mismo gel pero que no estaban contiguas. b) Niveles relativos de expresión de los genes inflamatorios. a-b) Los gráficos de barras muestran la media \pm SEM. Los datos fueron analizados usando la prueba T para muestras relacionadas. *vs. basal; #vs. TNF- α ($p < 0.05$). AU: unidades arbitrarias; HD; control sano; IL: interleucina; NETs: redes extracelulares de neutrófilos; NF- κ B: factor nuclear-B; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; STAT: transductor de señales y activador de la transcripción; TNF: factor de necrosis tumoral.

El tratamiento con la enzima ADNasa abolió el aumento de la actividad proinflamatoria de las células mononucleares inducido por el TNF, lo que señala al proceso de la NETosis como el principal inductor de las PBMCs circulantes. Por lo tanto, estos datos ponen de relieve la función de la NETosis en el establecimiento de un estado inflamatorio en pacientes con EspAax-r, y los efectos inhibitorios de ambos con tratamientos biológicos.

6.2. Estudio de la evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural

6.2.1. Riesgo cardiovascular en pacientes con EspAax

Entre los 114 pacientes con EspAax y los 132 controles relacionados por edad y sexo, el 61.2% eran varones, con una edad media de 44.35 ± 11.55 años, y el 92.7% de los pacientes tomaban AINEs. Ningún paciente se encontraba en tratamiento con terapia biológica. Las características demográficas y clínicas de los participantes en el estudio se muestran en la Tabla 6.

Al analizar las características relacionadas con el riesgo CV, observamos que los pacientes con EspAax tenían un aumento estadísticamente significativo del hábito tabáquico, de la prevalencia de HTA, obesidad y diabetes mellitus tipo II, así como del riesgo aterogénico en comparación con los del grupo control. No se hallaron diferencias en cuanto a la glucosa, el colesterol total, el HDL-C, el LDL-C, los triglicéridos, la relación ApoB/ApoA o los niveles de ácido úrico entre ambos grupos.

La evaluación sistemática del riesgo coronario (SCORE), que predice el riesgo absoluto individual de eventos CV fatales, mostró que los pacientes con EspAax presentaban un riesgo más alto que los controles sanos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando los sujetos se clasificaron por bajo (<10% de sufrir un evento CV), moderado (10-20%), alto (20-30%) y muy alto riesgo (>30%), dependiendo de los niveles de SCORE, observamos que entre los pacientes con EspAax, el 70.9% tenía un bajo riesgo CV y el 29.1% presentaba un elevado riesgo CV (moderado, alto y muy alto), mientras que el 86.4% de los controles sanos se clasificaron como de bajo riesgo CV y el 13.6% como de elevado riesgo CV (Tabla 6).

	Pacientes EspAax (n=114)	Controles sanos (n=132)	p
Edad (años)	45.73±12.15	43.09±10.86	0.077
Sexo (masculino)	77 (67.50)	71 (55.50)	0.054
HLA B27 (positivo)	93 (82.30)	4 (6.70)	<0.001*
Historia familiar de EspA	38 (33.60)	2 (11.10)	
Sacroilitis radiográfica	90 (81.10)		
Dolor lumbar inflamatorio	96 (85.71)	2 (10.50)	
Artritis	16 (14.10)	0	
Psoriasis	13 (11.40)	0	
IMC (kg/m ²)	26.62±4.25	20.13±9.40	<0.001*
Duración de la enfermedad (años)	19.24±13.36		
EVA global	43.33±25.19		
ASDAS-PCR	2.44±0.93		
ASAS HI	4.75±4		
BASDAI	3.68±2.13		
BASFI	2.85±2.48		
BASMI	3.10±1.80		
PCR (mg/L)	5.75±7.76	1.43±1.72	<0.001*
AINEs	102 (92.70)	2 (1.70)	
Tratamiento biológico	0	0	
mSASSS total	15.26±17.18		
mSASSS cervical	7.27±9.09		
mSASSS lumbar	8.09±9.38		
Fumador (sí)	37 (32.7)	12 (14.3)	0.003*
Obesidad	23 (20.7)	4 (6.6)	0.015*
Hipertensión arterial	21 (18.6)	2 (1.6)	<0.001*
Diabetes tipo 2	2 (1.8)	0	0.138
Glucosa (mg/dL)	83.60±14.43	85.98±13.94	0.244
Insulina (mU/L)	6.40±3.99	8.71±5.25	0.005*
Resistencia a la insulina	1.42 (1.09)	1.89 (1.29)	0.008*

Colesterol total (mg/dL)	190.02±31.37	197.79±30.64	0.065
Colesterol-HDL (mg/dL)	55.42±14.81	56.74±14.89	0.514
Colesterol-LDL (mg/dL)	114.46±29.7	121.50±24.63	0.058
Triglicéridos (mg/dL)	101.10±60.98	97.79±53.24	0.668
Apo A (mg/dL)	143.09±21.13	150.75±27.33	0.024*
Apo B (mg/dL)	80.02±17.56	89.43±25.42	0.002*
Apo B/Apo A risk	0.58±0.18	0.61±0.19	0.186
Riesgo aterogénico	12 (17.1)	1 (7.1)	0.685
Ácido úrico (mg/dL)	5.07±1.31	5.06±1.25	0.972
Presencia de placas ateroscleróticas	16 (16.3)	2 (3.3)	0.011*
cIMT derecho (mm)	0.54 (0.12)	0.57±0.14	0.326
cIMT izquierdo (mm)	0.56 (0.13)	0.57±0.09	0.577
SCORE			
- Riesgo bajo	73 (70.9)	19 (86.4)	0.100
- Riesgo moderado, alto y muy alto	30 (29.1)	3 (13.6)	

*Tabla 6. Características demográficas y clínicas relacionadas con el riesgo cardiovascular de los pacientes con espondiloartritis axial y controles sanos. Los datos se muestran como media (desviación estándar) o frecuencia (porcentaje). EspA: Espondiloartritis; IMC: Índice de masa corporal; EVA: Escala analógica visual; ASDAS-PCR: Puntuación de actividad de la enfermedad de la espondilitis anquilosante-Proteína C Reactiva; ASAS HI: Evaluación del índice de salud de la Sociedad Internacional de Espondiloartritis; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASMI: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; PCR: Proteína C Reactiva; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos; mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; Apo: Apolipoproteína; cIMT: grosor de la íntima-media carotídea. *Diferencias estadísticamente significativas.*

6.2.2. Asociación entre el riesgo CV estimado y el daño estructural

En los pacientes con EspAax, los estudios de correlación mostraron que el SCORE se asociaba significativamente con el daño estructural: mSASSS total (Figura 12A), mSASSS cervical y lumbar (Figura 12B y C), sindesmofitos (Figura 12D) y puentes óseos (Figura 12E).

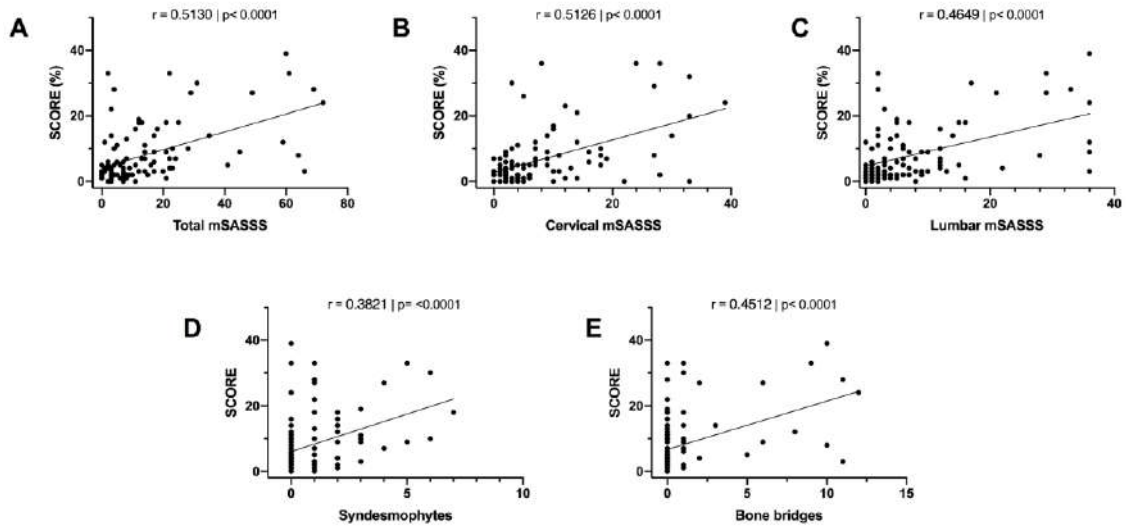


Figura 12. Asociación entre los niveles de SCORE y el daño estructural en pacientes con EspAax. (A) Correlación entre SCORE y mSASSS total. (B) Correlación entre SCORE y mSASSS cervical. (C) Correlación entre SCORE y mSASSS lumbar. (D) Correlación entre SCORE y el número de sindesmofitos. (E) Correlación entre SCORE y el número de puentes óseos. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score.

Además, la presencia de placas ateroscleróticas carotídeas se correlacionó con un aumento de mSASSS total (Figura 13A), mSASSS cervical y lumbar (Figura 13B y C), sindesmofitos (Figura 13D) y puentes óseos (Figura 13E).

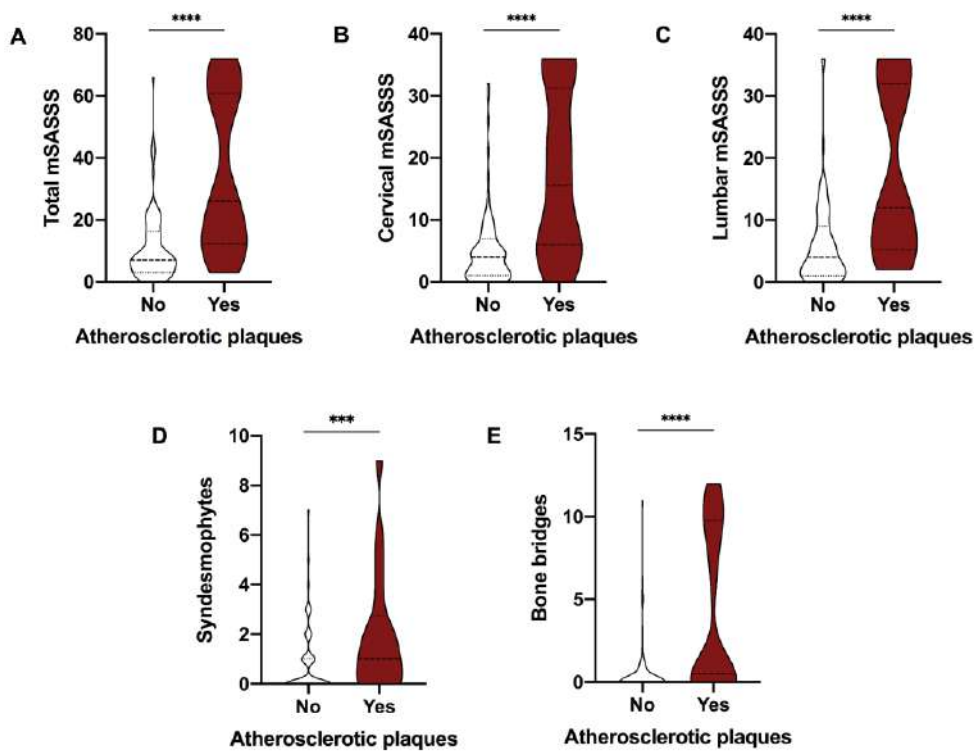


Figura 13. Presencia de placas ateroscleróticas carotídeas en pacientes con EspAax según el daño estructural. mSASSS total (A), mSASSS cervical (B), mSASSS lumbar (C), número de sindesmofitos (D) y número de puentes óseos (E) en pacientes con EspAax con o sin placas ateroscleróticas. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score.

A continuación, para controlar el posible efecto de la edad sobre el incremento del riesgo CV, se realizó un análisis de correlación en dos grupos de pacientes generados según la mediana de edad (47 años), y se observó que la correlación entre el mSASSS total y el SCORE se mantuvo en ambos grupos de edad (Tabla 7).

Edad	r (mSASSS total-SCORE)	p
≤47 años	0.26	0.049*
>47 años	0.459	0.002*

Tabla 7. Análisis de correlación en los grupos de pacientes según la mediana de edad. r, coeficiente de correlación entre el mSASSS total y el índice SCORE; p, significación estadística; * diferencias estadísticamente significativas. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score.

Así mismo, después de ajustar según la duración de la enfermedad, la condición de fumador, el aumento persistente de los niveles de PCR (al menos tres determinaciones en los últimos 5 años) y la ingesta de AINEs, observamos que el mSASSS total se asociaba independientemente con el SCORE: 1 punto en el mSASSS total aumentó el SCORE en 0.24 puntos, siendo el mSASSS cervical el que presentaba una mayor influencia en el SCORE: por cada punto de incremento en el mSASSS cervical se incrementaba el SCORE en 0.42 puntos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

	Modelo crudo		Ajustado por edad y tabaquismo		Ajustado por edad, tabaquismo y pcr elevada*		Ajustado por edad, tabaquismo, pcr elevada* y toma de aines		Ajustado por duración de la enfermedad, tabaquismo, pcr elevada* y toma de aines	
	Coficiente β (IC 95%)	p	Coficiente β (IC 95%)	p	Coficiente β (IC 95%)	p	Coficiente β (IC 95%)	p	Coficiente β (IC 95%)	p
mSASSS total	0.27 (0.18-0.36)	<0.001	0.11 (0.03-0.20)	0.007	0.17 (0.05-0.29)	0.009	0.16 (0.03-0.28)	0.018	0.24 (0.10-0.38)	0.001
mSASSS cervical	0.53 (0.35-0.70)	<0.001	0.24 (0.08-0.39)	0.003	0.31 (0.07-0.53)	0.012	0.29 (0.05-0.53)	0.022	0.42 (0.14-0.71)	0.006
mSASSS lumbar	0.44 (0.28-0.61)	<0.001	0.16 (0.18-0.31)	0.030	0.25 (0.06-0.45)	0.014	0.24 (0.04-0.45)	0.024	0.39 (0.16-0.61)	0.002

Tabla 8. Asociación entre el mSASSS y el SCORE ajustando por edad, tabaquismo, PCR, toma de AINEs y duración de la enfermedad. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score; AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos; PCR: Proteína C Reactiva. *PCR elevada: determinación de PCR elevada más del 50% de los momentos temporales durante 5 años.

El mSASSS total también se asocia significativamente con la presencia de placas ateroscleróticas después de ajustar por la duración de la enfermedad, el estatus de fumador, la PCR y la ingesta de AINEs, observando que 1 punto en el mSASSS total aumentaba el riesgo de placas ateroscleróticas 1.05 (1.01 – 1.12) veces (Tabla 9).

	Modelo crudo		Ajustado por edad y tabaquismo		Ajustado por edad, tabaquismo y pcr elevada*		Ajustado por edad, tabaquismo, pcr elevada* y toma de aines		Ajustado por duración de la enfermedad, tabaquismo, pcr elevada* y toma de aines	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
mSASSS total	1.07 (1.04–1.11)	<0.001	1.04 (1.01–1.08)	0.019	1.05 (0.99–1.11)	0.076	1.05 (0.99–1.12)	0.096	1.05 (1.01–1.12)	0.034
mSASSS cervical	1.13 (1.07–1.20)	<0.001	1.08 (1.02–1.56)	0.019	1.07 (0.98–1.17)	0.128	1.06 (0.98–1.16)	0.155	1.09 (1.00–1.19)	0.042
mSASSS lumbar	1.11 (1.06–1.18)	<0.001	1.07 (1.01–1.14)	0.036	1.09 (1.00–1.21)	0.062	1.09 (0.99–1.22)	0.070	1.10 (1.01–1.22)	0.037

Tabla 9. Asociación entre el mSASSS y la presencia de placas ateroscleróticas ajustando por edad, tabaquismo, PCR, toma de AINEs y duración de la enfermedad. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score; AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos; PCR: Proteína C Reactiva. *PCR elevada: determinación de PCR elevada más del 50% de los momentos temporales durante 5 años.

6.2.3. Asociación entre el riesgo CV medido por el SCORE y la ecografía carotídea en pacientes con EspAax

Dado que el riesgo CV se evalúa mediante el SCORE en múltiples escenarios, quisimos estudiar si este índice podría reflejar el riesgo CV subclínico hallado en la ecografía carotídea (cIMT y presencia de placas ateroscleróticas). Encontramos que la estratificación en elevado riesgo (incluyendo riesgo intermedio, alto y muy alto) según los niveles de SCORE aumentaba el riesgo de placa aterosclerótica en 14.07 (3.91-50.64) veces ($p < 0.001$). Sin embargo, el 5.48% de los pacientes clasificados como de bajo riesgo (4/73) tenían aterosclerosis subclínica debido a la presencia de placa carotídea aterosclerótica, que representaba el 25% (4/16) del total de las placas ateroscleróticas observadas en nuestra población de estudio (Tabla 10 y Tabla 11). Estos datos reflejan la falta de asociación entre el SCORE y la presencia de aterosclerosis subclínica.

Total	Presencia de placa aterosclerótica	GIM carotídeo derecho	GIM carotídeo izquierdo
-------	------------------------------------	-----------------------	-------------------------

SCORE bajo riesgo	73 (70.9)	4 (25)	0.51 (0.1)	0.52 (0.1)
SCORE alto riesgo	30 (29.1)	12 (75) ^a	0.61 (0.11) ^b	0.64 (0.16) ^c

Tabla 10. Análisis de la presencia de placas ateroscleróticas según los grupos de riesgo CV por el SCORE. Los datos se expresan como N (%) o media (DT). Diferencias estadísticamente significativas con (a) la presencia de placas ateroscleróticas en pacientes EspAax con bajo riesgo según SCORE ($p<0.001$), (b) GIM carotídeo derecho derecho en pacientes EspAax con bajo riesgo según SCORE ($p<0.001$), (c) vs. GIM carotídeo izquierdo izquierdo en pacientes de EspAax con bajo riesgo según SCORE ($p<0.001$).

	Placa aterosclerótica		OR e IC 95%	P
	Presente (16)	Ausente (74)		
SCORE alto riesgo (30)	12	18	14.07 (3.91-50.64)	<0.001
SCORE bajo riesgo (73)	4	69		

Tabla 11. Asociación entre la presencia de placas ateroscleróticas y el riesgo CV según el SCORE.

6.2.4. Análisis de clusters

El análisis de clusters basados en la presencia de placas carotídeas y los niveles de cIMT derecho e izquierdo (Figura 14A-C) permitió diferenciar dos fenotipos diferentes de pacientes según la prevalencia de factores de riesgo CV. Estos grupos fueron ajustados según la edad. Los datos de la ecografía de las arterias carótidas se utilizaron para estratificar a los pacientes, ya que según nuestros resultados previos (Tabla 10), el SCORE no refleja totalmente la presencia de aterosclerosis subclínica. Así, el grupo 1 se caracterizó por un aumento significativo del riesgo CV en comparación con el grupo 2, mostrando mayores tasas de hábito tabáquico, obesidad, índice aterogénico, resistencia a la insulina y diabetes de tipo II (Figura 14D).

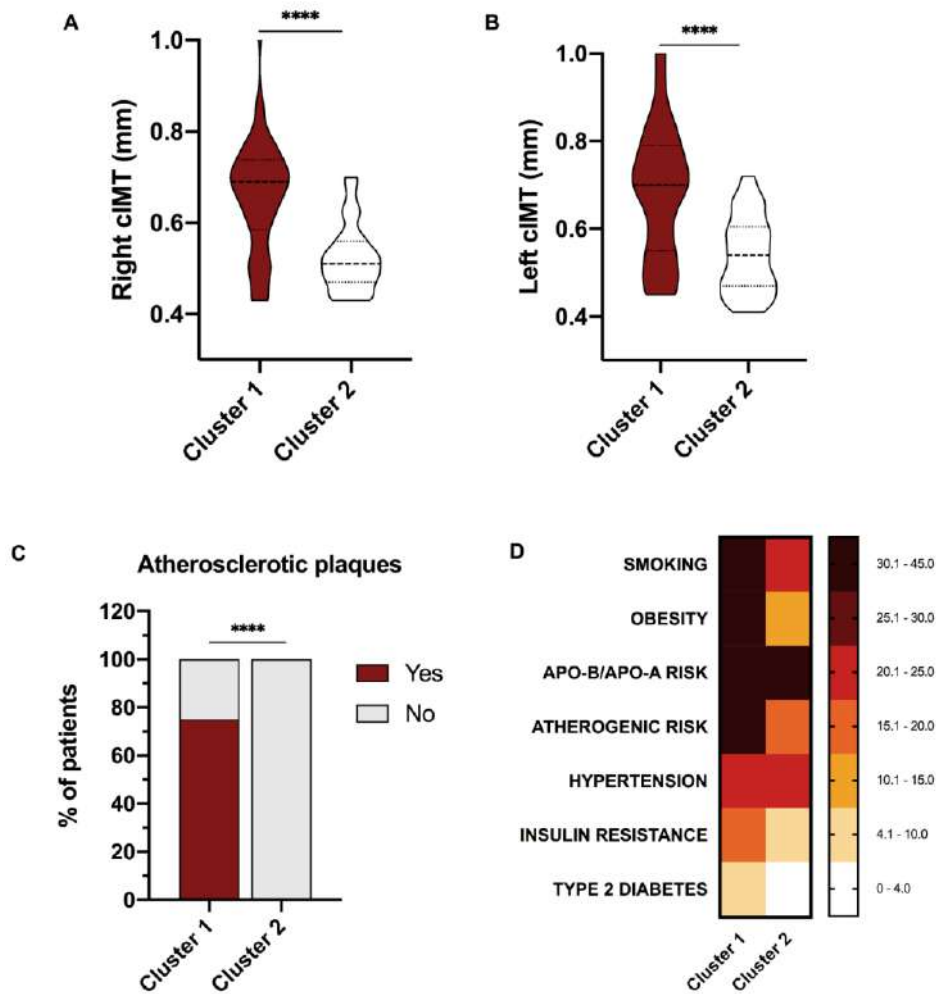


Figura 14. El análisis de clusters, según la presencia de placas carotídeas y los niveles de cIMT derecho e izquierdo, reconoce dos fenotipos diferentes de pacientes con EspAax según su riesgo CV. (A) Niveles de cIMT derecho en el grupo 1 y en el grupo 2. (B) Niveles de cIMT izquierdo en el grupo 1 y el grupo 2. (C) Presencia/ausencia de placas ateroscleróticas en el grupo 1 y el grupo 2. (D) El análisis de clusters, que incluye la presencia de placas carotídeas y los niveles de cIMT derecho e izquierdo como variables, distinguió dos fenotipos diferentes de pacientes con diferente prevalencia de factores de riesgo CV. **** $p < 0.0001$. cIMT: grosor de la íntima media de la carótida.

Además, el grupo 1 presentaba niveles de SCORE significativamente mayores en comparación con los del grupo 2 (Figura 15A). Cabe destacar que el grupo 1, que no presentaba diferencias en la edad media con respecto al grupo 2, mostraba niveles significativamente mayores de mSASSS total (Figura 15B), mSASSS cervical (Figura 15C), mSASSS lumbar (Figura 15D) y mayor número de puentes óseos (Figura 15E). Así, los pacientes incluidos en el grupo 1 tenían mayores niveles de SCORE, junto con mayores niveles de cIMT derecha (Figura 15F) y mSASSS total (Figura 15G).

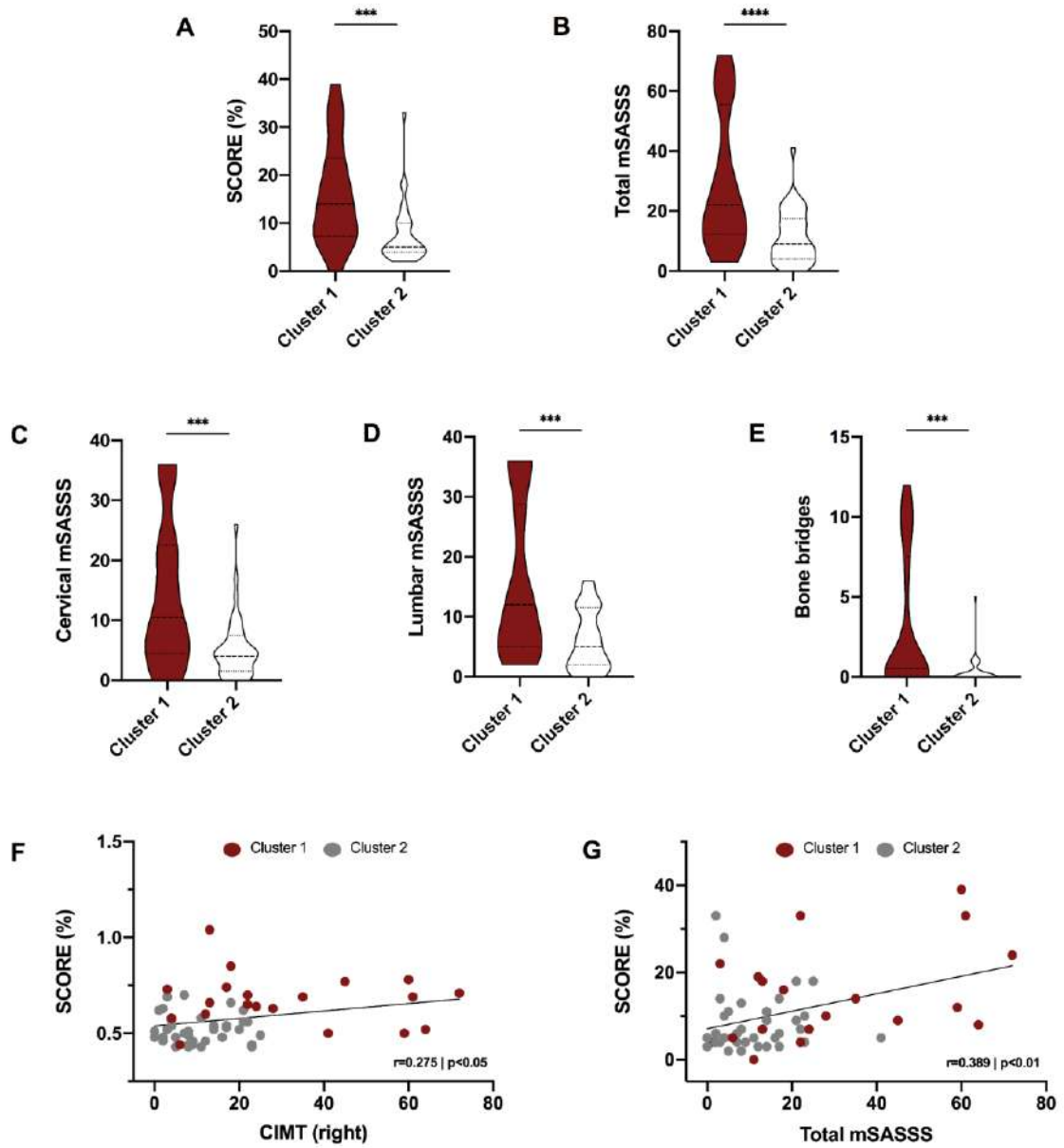


Figura 15. SCORE y daño estructural en clusters que reconocen dos fenotipos diferentes de pacientes con EspAax según el riesgo CV subclínico: aterosclerosis. (A) SCORE. (B) mSASSS total. (C) mSASSS cervical. (D) mSASSS lumbar. (E) Número de puentes óseos. (F) Correlación entre SCORE y CIMT derecho. (G) Correlación entre SCORE y el total de mSASSS. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. mSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score; CIMT: grosor de la íntima media de la carótida.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El más importante logro alcanzado en esta Tesis Doctoral ha sido aportar nuevas evidencias al cuerpo de doctrina de la fisiopatología de las Espondiloartritis. En este trabajo hemos estudiado el papel del proceso de la NETosis en la etiopatogenia de la EspAax-r, el papel potencial de los productos derivados de la NETosis en circulación como biomarcadores diagnósticos y de actividad de la enfermedad, el papel beneficioso del tratamiento con anti TNF- α sobre este proceso celular, así como la asociación presente entre el daño estructural y el riesgo CV estimado en los pacientes con EspAax.

En este sentido nuestros trabajos han aportado dos nuevos elementos a considerar en la etiopatogenia de esta enfermedad:

7.1. Papel de la NETosis en la patogénesis de la EspAax-r

En los últimos años, la NETosis, un mecanismo de muerte celular específica de neutrófilos, ha cobrado especial relevancia en la fisiopatología de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, incluyendo la AR y el LES (109) (250). Por tal motivo, en el presente trabajo nos planteamos analizar la generación espontánea de NETosis en pacientes con EspAax-r, un proceso hasta el momento no descrito en dicha patología.

Nuestro estudio fue el primero en demostrar que los neutrófilos aislados de pacientes con EspAax-r exhiben generación espontánea de NETosis, lo que apunta a un potencial nuevo mecanismo involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Además, encontramos que, en circulación, los productos derivados de la NETosis extracelulares, como biomarcadores, podrían distinguir a los pacientes con EspAax-r de los individuos sanos, así como discriminar a los pacientes según la actividad de la enfermedad. Así mismo, nuestro estudio reveló un efecto directo de la terapia anti TNF- α en la inhibición del proceso de NETosis, evitando así los efectos secundarios tóxicos promovidos por este fenómeno sobre la inflamación.

La EspAax-r es una patología inflamatoria sistémica crónica (251) en la que las células del sistema inmune son esenciales para la patogénesis de la enfermedad (252) (253) (254). Dentro de ésta, los neutrófilos activados juegan un papel crucial en la inmunidad innata (255) y su activación se ha involucrado en la progresión de los síntomas de la enfermedad (96) (256). No obstante, hasta la fecha, no se ha evaluado la posible implicación de los eventos NETóticos en la fisiopatología de esta enfermedad reumática.

La NETosis es un fenómeno implicado en la respuesta inmunológica innata contra las infecciones mediante la cual los neutrófilos atrapan y/o destruyen a los patógenos. Sin embargo, la formación de redes extracelulares, NETs, puede funcionar como un arma de doble filo, contribuyendo no sólo al control de los patógenos, sino también como una posible fuente de moléculas con funciones proinflamatorias que podrían contribuir al daño dentro de los tejidos inflamados. En consecuencia, la NETosis podría estar implicada en el desarrollo y la evolución de algunas enfermedades reumáticas. En este sentido, la formación de NETosis se ha asociado a la patología de varias enfermedades autoinmunes, entre ellas la AR y el LES (106) (107) (108). En consecuencia, la NETosis podría estar implicada en el desarrollo y la evolución de algunas enfermedades reumáticas. En la AR, se ha demostrado que las NETs contienen elevadas cantidades de PAD2 y PAD4, enzimas que se asocian a la generación de autoantígenos citrulinados en esta patología. En efecto, entre las proteínas citrulinadas por estas enzimas se encuentran la vimentina y la α -elonasina, ambas componentes de las NETs y dianas de anticuerpos frente a péptidos/proteínas citrulinadas (ACPA). Uno de los modelos propuestos para explicar el papel patológico de la NETosis en la AR consiste en un loop, en el que las citoquinas inflamatorias y autoanticuerpos (FR y ACPA) activarían al neutrófilo, activación que produciría NETs y, por tanto, la formación de antígenos citrulinados que favorecerían la producción de más autoanticuerpos. Además, la generación de NETs activaría a los fibroblastos sinoviales que producirían mediadores inflamatorios que a su vez activarían a los neutrófilos que generarían NETs, provocando el daño articular observado en esta patología (109) (257) (258). Además, recientemente se ha identificado en AR un nuevo tipo de granulocitos más susceptibles de producir NETs que los neutrófilos normales. Estas células, denominados granulocitos de baja densidad, son altamente inflamatorias, producen elevados niveles de IFN e inducen citotoxicidad en el endotelio conduciendo al daño vascular (259).

En relación al LES, un estudio que analizó la asociación de la formación aberrante de NETs con la nefritis lúpica (108) demostró que la DNAsa1 sérica es necesaria para degradar las NETs. Observaron que los pacientes con LES presentaban un incremento de NETosis como consecuencia del bloqueo de la DNAsa1, un efecto producido por un inhibidor específico de la DNAsa1 y/o la unión de autoanticuerpos a las NETs que las protegen de su degradación por la enzima. Además, propusieron que las NETs, junto con los restos celulares apoptóticos y necróticos, podrían ser una fuente de autoantígenos y de patrones moleculares inmunoestimuladores asociados al daño tisular en el LES. En particular, la formación de NETs implica a ROS que modifican el ADN y las proteínas, haciéndolas más inmunogénicas y es posible que los anticuerpos anti-NETs y las NETs persistentes formen "inmunocomplejos NETs", que

podrían ser relevantes en la exacerbación del LES. Esto está respaldado por la observación de que los complejos IgG-cromatina potencian la producción de autoanticuerpos (260).

En el presente estudio se amplían estas observaciones y se muestra que la generación espontánea de NETosis también se encuentra incrementada en la EspAax-r, lo que se asoció además a modificaciones en la cascada de transducción de señales necesaria para la inducción de este fenómeno. Entre ellas, la generación de ROS, un proceso esencial que induce la formación de NETosis. Un estudio previo realizado por Ugan *et al.*, (95) demostró que los neutrófilos aislados de pacientes con EspAax-r presentaban un aumento del estrés oxidativo en comparación con aquellos obtenidos de los controles sanos, un incremento que podría estar mediado por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, y que podría ser revertido por el anticuerpo monoclonal anti-TNF- α infliximab. Los datos obtenidos en nuestro presente trabajo corroboran los hallados por Ugan *et al.*, (95). En concreto, detectamos una fuerte carga oxidativa en neutrófilos de los pacientes respecto a los donantes sanos, lo que se evidenció por un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, así como una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial en los neutrófilos derivados de pacientes con EspAax-r. Así mismo, nuestro estudio amplía estas observaciones y encontramos también niveles elevados de otras moléculas implicadas en la vía de señalización de la NETosis: los neutrófilos derivados de pacientes con EspAax-r mostraron una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, junto con un aumento de la expresión de NE y MPO, la translocación nuclear de PAD4 y la citrulinación de la histona H3. En global, nuestros datos indican que estos elementos claves en la generación eficaz de NETs podrían servir como dianas potenciales para nuevas aproximaciones terapéuticas en pacientes con EspAax-r.

A continuación, evaluamos el potencial de los productos derivados de la NETosis como biomarcadores relacionados con la EspAax-r. Hallamos que los niveles circulantes de ADN, nucleosomas y elastasa extracelulares estaban aumentados en esta patología y que todos ellos permitían distinguir a los pacientes con EspAax-r de los controles sanos. Así mismo, la combinación de los tres marcadores NETóticos como panel demostró ser, además, un biomarcador eficaz para predecir la enfermedad en estos pacientes. Para explorar adicionalmente la relación de estos biomarcadores con la patología de la enfermedad, nuestro siguiente paso fue realizar estudios de correlación y confirmamos que los productos derivados de la NETosis se encuentran relacionados con parámetros inflamatorios y clínicos. Concretamente, encontramos que los niveles circulantes de los componentes de las NETs se correlacionaban con los niveles de citoquinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β), PCR y VSG. Además, los estudios de asociación demostraron que los niveles circulantes de nucleosomas

extracelulares estaban incrementados en los pacientes activos frente a los no activos. El análisis de la curva ROC reveló, adicionalmente, que este componente exhibía capacidad pronóstica de la actividad de la enfermedad. Estos resultados están en concordancia con un estudio previo realizado por nuestro grupo (261), en el que se demostró que los nucleosomas extracelular tenían potencial diagnóstico para discriminar a los pacientes con AR activa frente a los no activos.

La inhibición de la NETosis en pacientes con EspAax-r podría ser útil para evitar los efectos nocivos de las NETs sobre la inflamación. En el contexto de la EspAax-r, la introducción de fármacos inhibidores de la acción del TNF- α representó una revolución terapéutica para el tratamiento farmacológico de estos pacientes, demostrando ser muy eficaz para reducir la inflamación sistémica y mejorar la actividad de la enfermedad en estos pacientes (262) (263) (264). El TNF- α es una citoquina que promueve la inflamación, regula la extravasación de leucocitos, promueve la destrucción de tejidos e induce la formación de NETs (105) (265). En consecuencia, la alteración en la producción y/o función del TNF- α se ha asociado a la etiopatogenia de múltiples enfermedades reumáticas, incluyendo las EspAax-r (266). En efecto, una producción elevada de TNF a nivel de ARNm (267) y proteína (268) se ha detectado en biopsias de articulaciones sacroilíacas de pacientes con EspAax-r.

Un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación demostró que en los pacientes con AR tratados con infliximab mostraban una disminución de la generación espontánea de NETosis, reducción que se produjo en paralelo al descenso tanto de la actividad de la enfermedad como de la producción de mediadores inflamatorios en estos pacientes (261). Basándonos en estos resultados y en la eficacia de la terapia anti-TNF- α en la EspAax-r, nuestro estudio también evaluó los efectos de infliximab tanto en la generación espontánea de NETosis como en los efectos secundarios tóxicos promovidos por las NETs en la inflamación. Encontramos que el tratamiento con infliximab no sólo promovió una reducción de la actividad de la enfermedad sino también una reducción de la generación de NETosis en pacientes con EspAax-r, lo que se evidenció por un descenso en los niveles circulantes de los productos derivados de NETosis, una menor translocación nuclear de PAD4 y, por ende, una reducción en la citrulinación de la histona H3 en los neutrófilos aislados de los pacientes. Los estudios *in vitro* revelaron además el papel beneficioso del infliximab para reducir la liberación de NETs, como se demuestra por la disminución de las fibras de ADN, los niveles de ADN extracelular, y el porcentaje de neutrófilos teñidos de NE después de este tratamiento. Así mismo, la terapia con infliximab redujo el incremento de la actividad inflamatoria promovido por las NETs en las células mononucleares.

En resumen, nuestros datos muestran por primera vez que la NETosis está incrementada en pacientes con EspAax-r e identifica el papel potencial de los productos derivados de la NETosis en circulación como herramientas complementarias para identificar a los pacientes con EspAax-r de los donantes sanos, y como jugadores claves de la actividad de la enfermedad en esta patología. Así mismo, el presente estudio muestra el efecto inhibitorio de la terapia anti-TNF- α en la formación de las NETs, lo cual se produjo en paralelo a la reducción de la actividad de la enfermedad. Por tanto, el análisis de la generación de NETosis podría, adicionalmente, tener el potencial de valorar la eficacia terapéutica en pacientes con EspAax-r. Se requieren análisis adicionales que permitan esclarecer los efectos *in vivo* a largo plazo del tratamiento con infliximab en la formación de NETosis y el perfil inflamatorio desencadenado por este proceso celular, así como su asociación con el daño estructural (formación de sindesmoftos y puentes óseos entre las vértebras y en las articulaciones sacroilíacas a nivel axial) y elevado riesgo CV observado en esta patología (269).

7.2. Evaluación de la asociación del riesgo CV estimado y el daño estructural

El proceso patológico más común que conduce a la ECV es la aterosclerosis, una enfermedad de las arterias de mediano y gran calibre cuya prevalencia es 1.5 veces superior en pacientes con EspAax-r que en controles sanos (170). Esta patología se caracteriza por la formación de placas, consistentes en núcleos necróticos, regiones calcificadas, acumulación de lípidos modificados, células del músculo liso inflamadas, células endoteliales activadas, leucocitos y células espumosas (270). Estas características de las placas ateroscleróticas demuestran que la aterosclerosis es una enfermedad compleja, y que diversos componentes del sistema inmune, vascular y metabólico están involucrados en este proceso.

En pacientes con EspAax-r se ha observado una prevalencia incrementada de aterosclerosis subclínica (271) (272) (170), la cual está caracterizada por un engrosamiento patológico de la íntima media carotídea (272) (273) y por rigidez arterial (274) (275) (276) (277). Varios son los factores que podrían conducir al desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Los factores de riesgo tradicionales clásicos tales como la hipertensión y un perfil de lípidos aterogénico (169) juegan un papel crucial, pero no explican completamente la elevada prevalencia de aterosclerosis detectada en este trastorno (170). Por lo tanto, es probable que el estado inflamatorio generalizado observado en estos pacientes los haga más propensos a desarrollar enfermedad aterosclerótica, ya que los mecanismos inflamatorios asociados a la patogénesis de la aterosclerosis se asemejan a los observados en las enfermedades

reumatológicas (278) (279). En este sentido, se ha demostrado el impacto de la PCR elevada en los factores de riesgo CV tradicionales y, por tanto, en un mayor riesgo y mortalidad CV (280) (170), un reactante de fase aguda cuya elevada presencia es, además, asociada con la progresión radiográfica de estos pacientes (281). No obstante, existe controversia en relación a la asociación entre inflamación y aterosclerosis subclínica (271) (272), aunque el estado inflamatorio crónico presente en estos pacientes podría contribuir a todos los estadios de la aterosclerosis, incluyendo la formación temprana de la placa de ateroma, la inestabilidad de la placa y el desarrollo del trombo. Además, la contribución del daño estructural al incrementado riesgo CV y la presencia de aterosclerosis subclínica nunca se ha estudiado en esta patología.

En nuestro estudio se muestra, por primera vez, que los pacientes con EspAax con más daño estructural presentan un mayor riesgo CV estimado, independientemente de la duración de la enfermedad y de factores de riesgo tradicionales clásicos tales como la edad y el hábito de fumar (282), los cuales también están implicados en la progresión del daño radiográfico en los pacientes con EspAax (283).

En primer lugar, confirmamos la presencia de un mayor riesgo CV estimado en los pacientes con EspAax, hecho previamente demostrado por diversos estudios (284). El hábito de fumar, incrementado en nuestros pacientes en relación a controles sanos, se ha asociado con peores resultados en cuanto a daño estructural, respuesta al tratamiento y calidad de vida en los pacientes con EspA (285) (286). Además, la incrementada prevalencia de hipertensión arterial observada en nuestra cohorte es el factor de riesgo CV más prevalente en los pacientes con EspA, especialmente en los países del norte de Europa, según los datos del estudio COMOSPA (287). Considerando el consumo de AINEs, la mayoría de nuestros pacientes estuvieron tratados con este tipo de fármacos, y estudios recientes ha puesto de relieve la relación entre el aumento del IMC con la neoformación ósea, a nivel tanto axial como periférico, y la inflamación de la entesis (288), aunque se ha propuesto que la prevalencia de la obesidad es mayor en los pacientes con formas periféricas de EspA (289). Además, el aumento de diabetes tipo 2 observado en nuestro estudio también se ha relacionado con formas periféricas de EspA y artritis psoriásica (290) (291). Así mismo, se ha reportado que otro factor de riesgo CV, el riesgo aterogénico, es mayor en los pacientes con EspAax (292) (190), y en nuestro estudio hallamos que el riesgo aterogénico también aumentó significativamente en nuestra cohorte de pacientes con EspAax.

En segundo lugar, el índice SCORE es la herramienta recomendada por la guía de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) 2016 sobre prevención de enfermedad CV en la práctica clínica, para estimar el riesgo absoluto individual de eventos CV fatales (181). El SCORE incluye la edad,

el sexo, los niveles de lípidos, el consumo de tabaco y la presión sanguínea, siendo la edad la variable con mayor influencia con el riesgo estimado de eventos CV fatales. En nuestro registro, encontramos que los niveles de SCORE estaban aumentados en los pacientes con EspAax cuando se comparaban con los de los controles sanos relacionados en edad, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Esto podría deberse a que el índice SCORE puede subestimar el riesgo CV en los pacientes con EspA (293), ya que no se ha descrito la necesidad de multiplicar el riesgo en presencia de diagnóstico de EspA, como se realiza en otras patologías como la AR, en la que el riesgo CV determinado por el SCORE se multiplica por 1.5 (294). A pesar de ello, cuando los pacientes con EspAax y los controles sanos incluidos en nuestro estudio se clasificaron por riesgo CV bajo, moderado, alto y muy alto según los niveles de SCORE, observamos que entre los pacientes con EspAax, el 70.9 % tenía un riesgo CV bajo, el 18.4 % tenía un riesgo CV moderado, el 6.8 % tenía un riesgo CV alto y el 3.9 % tenía un riesgo CV muy alto, lo que difirió del riesgo CV presente en los controles sanos, con el 86.4 % clasificado como de riesgo CV bajo y el 13.6 % como de riesgo CV moderado.

En nuestro estudio, el daño estructural se midió en términos de mSASSS total, cervical y lumbar que, hasta la fecha, es la herramienta más validada y ampliamente utilizada para medir la progresión radiográfica en la EspAax-r, ya que presenta una buena correlación con los signos y síntomas de la enfermedad, la movilidad de la columna vertebral y la función física (295). La presencia de sindesmofitos y puentes óseos, los cuales se muestran como los más relevantes cambios estructurales en EspAax-r (296), también fueron evaluados. Hallamos que las características estrechamente relacionadas con el riesgo CV como los niveles de SCORE, la presencia de placas ateroscleróticas y los niveles de GIM carotídeo derecho e izquierdo estaban asociadas con el mSASSS, así como con la presencia de sindesmofitos y puentes óseos, lo que implica una asociación entre el daño radiográfico y el riesgo CV estimado. En este sentido, Kang KY *et al.*, (297) encontraron una asociación entre la progresión radiográfica en la columna vertebral y un alto riesgo estimado de enfermedad CV a 10 años medido por la puntuación de riesgo de Framingham.

Cabe destacar que Rueda Gotor *et al.*, demostraron que el índice SCORE subestima el riesgo CV real de los pacientes con EspAax y propusieron el uso de herramientas adicionales, como la ecografía de la carótida, para mejorar la identificación de los pacientes con EspAax con alto riesgo de desarrollar enfermedad CV (298) (299) (300). En este contexto, decidimos realizar un análisis de cluster, incluyendo la presencia de placas carotídeas y los niveles de cIMT derecho e izquierdo como variables. Curiosamente, nuestro análisis nos permitió distinguir dos fenotipos diferentes de pacientes según su prevalencia de factores de riesgo CV, y estos dos grupos

diferentes se ajustaron según la edad. En el primer cluster, con un mayor número de placas ateroscleróticas y un mayor grosor de la íntima media carotídea, hubo una mayor prevalencia de hábito de fumar, obesidad, índice aterogénico, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, con niveles significativamente mayores de SCORE pero, sorprendentemente, este cluster también mostró niveles significativamente mayores de mSASSS total, cervical y lumbar, así como una mayor presencia de puentes óseos y grado de sacroiliitis izquierda y derecha.

Un estudio reciente realizado por Eriksson JK *et al.*, comparó la prevalencia de los eventos CV entre los pacientes con AR y los EspAax. Hallaron que el riesgo de los accidentes cerebrovasculares era similar en ambas patologías, aunque los pacientes con EspAax tuvieron un riesgo menor de eventos trombóticos y síndromes coronarios agudos (301). Mientras que en AR el riesgo CV incrementado y su asociación con la carga inflamatoria está bien definido (302) (303) (304), pocos estudios han analizado este tipo de relación en la EspAax. Sí se ha observado que el uso actual de biológicos se asocia a una reducción de las enfermedades CV graves en pacientes tanto con AR, APs y EspAax-r (305). Además, la obesidad se ha asociado a una mayor inflamación, actividad de la enfermedad, movilidad física, daño radiográfico, índice de salud, función hepática y factores de riesgo cardiovascular en la EspAax-r (306). En línea con estos estudios, en nuestro presente trabajo hallamos que los pacientes con EspAax con inflamación persistente, definida como presencia de niveles anormales de PCR en >50% de las determinaciones realizadas a los pacientes en los últimos 5 años, exhibían un aumento de la cIMT derecha e izquierda, así como un mayor número de sindesmofitos, lo que podría señalar a la PCR y, por consiguiente, a la presencia de una inflamación subyacente mantenida, como un vínculo entre el aumento del riesgo de CV y el daño estructural en estos pacientes.

El papel de la PCR en el daño estructural presente en los pacientes con EspAax está bien definido, y se ha establecido que la progresión radiográfica a nivel axial es el resultado de la inflamación crónica en los pacientes con EspAax (307) (308) (309). Se ha observado que el microdaño local puede desencadenar que las células progenitoras residentes en el tejido formen nuevo hueso, un proceso que parece estar provocado por una inflamación persistente (116). Además, y quizás más importante, la inflamación resulta en una pérdida ósea local y sistémica, un fenómeno particularmente importante en la columna vertebral. La pérdida de hueso afecta a las propiedades biomecánicas de la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas, desencadenando inestabilidad a nivel de los tejidos (310). En un esfuerzo por recuperar la estabilidad, podrían activarse procesos de neoformación ósea patológica, dando lugar en último término a anquilosis (311). Nuestro estudio no sólo corrobora la relación entre inflamación y neoformación ósea, sino que también destaca a la inflamación como un vínculo más relevante

entre el daño radiográfico y el riesgo CV que la edad. De hecho, en la relación entre el daño estructural y el riesgo cardiovascular, destacan cinco factores de confusión importantes: la edad (283), el hábito de fumar (285), los niveles de PCR, la ingesta de AINEs y la duración de la enfermedad. Estas variables influyen directamente tanto en el daño estructural como en el riesgo CV. Por lo tanto, cuando se evalúa la relación entre el daño estructural y el riesgo cardiovascular, estas variables deben ser consideradas. Teniéndolas en cuenta, encontramos una asociación independiente entre el mSASSS total y el SCORE, y entre el mSASSS total y la presencia de placas ateroscleróticas. Además, el mSASSS podría considerarse como un marcador de la carga inflamatoria previa, junto con los niveles de PCR analizados desde el comienzo de la enfermedad (y no sólo en los últimos 5 años), lo que también explicaría la asociación con el riesgo CV estimado encontrado en nuestro estudio.

En cuanto al posible papel de los AINEs en la aterosclerosis, el metabolismo del ácido araquidónico está implicado en la fisiopatología de las enfermedades isquémicas CV, y se ha prestado especial atención a la vía catalizada por la ciclooxigenasa (COX), la cual conduce a la producción de prostanoïdes. Hasta la fecha, se han identificado dos isoformas COX, designadas como COX-1 y COX-2, y una variante de la COX-1, la COX-3 (312). La isoforma COX-1 se expresa constitutivamente y está implicada en el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la integridad de la mucosa gastrointestinal o las funciones homeostáticas (313). La isoforma COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios y origina prostaglandinas inductoras, que contribuyen al edema, rubor, fiebre e hiperalgesia, y prostaciclina en respuesta al estrés de cizallamiento. Debido a la relativa escasez de la expresión de COX-2 en el tracto gastrointestinal y su gran expresión en los tejidos inflamatorios, se desarrollaron e introdujeron en terapia los COXIBs, con el objetivo de disminuir los efectos adversos gastrointestinales observados con los AINEs tradicionales. Sin embargo, el uso de los COXIBs reveló una propensión a trombosis, por el desbalance protrombótico/antitrombótico en la superficie endotelial, además de una pérdida del efecto protector de COX-2 en la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio (314) (315) (316). El equilibrio entre las isomerasas de prostaglandinas proinflamatorias y anti-inflamatorias parece ser un importante determinante del papel de la COX-2 en la estabilidad de la placa (317).

Aunque los pacientes con EspAax-r con mayor daño estructural y, en consecuencia, con mayor mSASSS podrían ser los que realizan una mayor ingesta de AINEs y, por lo tanto, ser el grupo de pacientes con un mayor riesgo CV y número de eventos CV, algunos estudios realizados en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias han encontrado que el uso a largo plazo de algunos fármacos anti-inflamatorios, podría ayudar a disminuir el riesgo CV relacionado

con la situación de inflamación persistente observada en estos pacientes. En un estudio realizado por Haroon *et al.*, se mostró un efecto protector de los AINEs tradicionales en la mortalidad vascular en pacientes con EspAax-r de ≥ 66 años de edad. Además, los COXIBs no se asociaron con un mayor riesgo de mortalidad vascular. De hecho, los AINEs podrían ser beneficiosos en las enfermedades inflamatorias al reducir el riesgo vascular general impuesto por la inflamación, y varios estudios realizados en pacientes con AR en el Reino Unido y Dinamarca mostraron una reducción de la mortalidad vascular con el uso de AINEs (53). En EspAax-r, se ha observado que el incremento de riesgo CV es evidente durante los primeros 6 meses de tratamiento y tiende a disminuir con el tratamiento frecuente y prolongado con AINEs (318). Además, en otro estudio se halló que la mortalidad vascular era mayor en el grupo de EspAax-r (HR: 1.36; IC95% 1.13-1.65) y que esta mortalidad descendía con el tratamiento con AINEs o estatinas (319). En nuestro estudio, se presentan los resultados procedentes de pacientes con ausencia de eventos CV (se excluyeron aquellos con historia de cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica o insuficiencia cardíaca), aunque la mayoría de ellos se encontraban en tratamiento permanente con AINEs. Actualmente, investigar cómo el tratamiento con AINEs afecta al riesgo CV en pacientes con enfermedades inflamatorias reumáticas, en particular la EspAax, y si éstos pacientes deben ser tratados con AINEs de forma continua o intermitente desde el punto de vista CV es una demanda apremiante (165). En la EspAax, sólo en raras ocasiones se ha evaluado la repercusión de los tratamientos anti-inflamatorios en la incidencia de eventos CV o en la mortalidad por esta causa (319).

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra el diseño transversal del mismo, el cual no permite encontrar una relación causal entre el daño estructural y el riesgo CV estimado. De hecho, la asociación entre el mSASSS y el riesgo CV ha sido identificada usando una variable subrogada, el índice SCORE. Sin embargo, en este análisis no hemos evaluado la prevalencia de eventos CV ya que excluimos a los pacientes con tales eventos, debido a que nuestro interés residía en evaluar el incremento del riesgo CV estimado. Para comprender mejor la asociación del daño estructural con el riesgo CV evaluado en términos de eventos CV, y los mecanismos subyacentes que implican la asociación entre el daño estructural radiográfico en la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas, el aumento del riesgo CV y la inflamación persistente, y la influencia de los tratamientos, se requieren estudios longitudinales con seguimiento prospectivo, que incluyan además la influencia no sólo de los tratamientos con AINEs, sino también de terapias biológicas eficaces sobre la actividad de la EspAax (anti-TNF- α , anti-IL-17).

A pesar de las limitaciones, las fortalezas de este estudio incluyen que todos los análisis se ajustaron por edad (que es un factor de confusión al estar relacionada con un mayor daño

estructural y con un mayor riesgo CV) y al gran número de pacientes incluidos. Además, la asociación entre el riesgo de CV y el daño estructural se ha ajustado además de según la edad, también según el tabaquismo, la inflamación persistente y la duración de la enfermedad, que son factores de confusión asociados biológicamente tanto con el SCORE como con el mSASSS.

En resumen, por primera vez, nuestros resultados apoyan una posible asociación del daño estructural y el riesgo CV estimado en pacientes con EspAax independientemente de la edad, el tabaco, la inflamación y la duración de la enfermedad.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- A. Los neutrófilos de pacientes con EspAax-r sufren generación espontánea de NETosis, indicativo de un potencial nuevo mecanismo involucrado en la patogénesis de la enfermedad.
- B. Los niveles circulantes de productos derivados de la NETosis extracelulares podrían ser biomarcadores útiles para la enfermedad y para discriminar a los pacientes según la actividad de la misma.
- C. Además de la actividad de la enfermedad, la terapia anti-TNF- α disminuye la generación de NETosis en los pacientes con EspAax-r.
- D. La inhibición de la NETosis mediante infliximab reduce la actividad inflamatoria de las células mononucleares de la sangre periférica, lo que sugiere un papel potencial de la generación de NET en la evaluación de la eficacia del tratamiento en pacientes con EspAax-r.
- E. Los pacientes con EspAax presentan un incrementado riesgo CV estimado.
- F. Los pacientes con EspAax-r con más daño estructural exhiben un mayor riesgo cardiovascular estimado, independientemente de la duración de la enfermedad, la edad y el hábito de fumar.
- G. La inflamación persistente en pacientes con EspAax se asocia con el elevado riesgo CV observado en esta enfermedad, lo que señala a la inflamación como la más importante conexión entre el daño radiográfico y el riesgo CV que la edad.

CONCLUSIONS

9. CONCLUSIONS

- A. Neutrophils from r-axSpA patients spontaneously undergo NETosis, underlying a new potential mechanism in the disease pathogenesis.
- B. Circulating levels of cell-free NETosis-derived products could be useful biomarkers for disease and for discriminating patients according to disease activity.
- C. In addition to disease activity, NETosis is down-regulated by anti-TNF- α therapy in r-axSpA patients.
- D. Inhibition of NETosis by infliximab reduces inflammatory activity of peripheral blood mononuclear cells, suggesting a potential role of NET generation for the assessment of treatment effectiveness in r-axSpA patients.
- E. Patients with axSpA present an increased estimated CV risk.
- F. AxSpA patients with more structural damage display increased predicted cardiovascular risk, independently of disease duration, age, and smoking habit.
- G. Persistent inflammation in patients with axSpA is associated with the increased CV risk observed in this disease, pointing to inflammation as a more important link between the radiographic damage and CV risk than age.

REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

1. Maxime Dougados, Dominique Baeten. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011; 377(9783): p. 2127-37.
2. J M Moll, I Haslock, I F Macrae, V Wright. Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1974; 53(5): p. 343-64.
3. Jacques P et al. Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and and stromal cells. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(2): p. 437-445.
4. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, Braun J, Chou CT, Collantes-Estevez E, Dougados M, Huang F, Gu J, Khan MA, Kirazli Y, Maksymowych WP, Mielants H, Sørensen IJ, Ozgocmen S, Roussou E, Valle-Oñate R, Weber U, Wei J, Si. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(6): p. 777-783.
5. The HSG, Steven MM, van der Linden SM, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a comparison of the Rome, New York and modified New York criteria in patients with a positive clinical history screening test for ankylosing spondylitis. 1985; 24: p. 242–249.
6. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984; 27(4): p. 361-368.
7. Amor B, Dougados M, Listrat V et al. Evaluation of the amor criteria for spondyloarthropathies and European spondyloarthropathy study group (ESSG). A cross-sectional analysis of 2238 patients. *Ann Med Interne*. 1991; 142(2): p. 85-89.
8. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, et al. The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum*. 1991; 34(10): p. 1218-1227.

9. Collantes-Estévez, Eduardo. Nuevos paradigmas en el diagnóstico y la clasificación de las espondiloartritis. *Reumatología Clínica*. 2013; 9(4): p. 199-200.
10. Collantes-Estevez E, Cisnal del Mazo A, Muñoz-Gomariz E. Assessment of 2 systems of spondyloarthropathy diagnostic and classification criteria (Amor and ESSG) by a Spanish multicenter study. European Spondyloarthropathy Study Group. *J Rheumatol*. 1995; 22(2): p. 246-51.
11. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, Dougados M, Huang F, Gu J, Kirazli Y, Van den Bosch F, Olivieri I, Roussou E, Scarpato S, Sørensen IJ, Valle-Oñate R, Weber U, Wei J, Sieper J. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(1): p. 25-31.
12. E. Collantes-Estévez, Luis R. Espinosa. Nonradiographic axial spondyloarthritis. What brings the new concept? *Clin Rheumatol*. 2015; 34: p. 195–197.
13. Lambert RG, Bakker PA, van der Heijde D, Weber U, Rudwaleit M, Hermann KG, Sieper J, Baraliakos X, Bennett A, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Pedersen SJ, Jurik AG, Maksymowych WP, Marzo-Ortega H, Østergaard M, Poddubnyy D, Reijniere M, van den Bos. Defining active sacroiliitis on MRI for classification of axial spondyloarthritis: update by the ASAS MRI working group. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75(11): p. 1958-1963.
14. MA, Khan. Update on spondyloarthropaties. *Ann Intern Med*. 2002; 136(12): p. 896-907.
15. MA, Khan. Clinical features of axial spondyloarthritis. In: Inman R, Sieper J, eds. *Oxford Textbook of Axial Spondyloarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press. 2016;: p. 91-100.
16. Sieper J et al. New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(6): p. 784-788.

17. J T Gran, G Husby. Ankylosing spondylitis in women. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 19(5): p. 303-12.
18. Clementina López-Medina, M Carmen Castro-Villegas , Eduardo Collantes-Estévez. Hip and Shoulder Involvement and Their Management in Axial Spondyloarthritis: a Current Review. *Curr Rheumatol Rep.* 2020; 22(9): p. 53.
19. Sieper J et al. The Assessment of Spondyloarthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68 (suppl II): p. ii1-ii44.
20. MA, Khan. Spondyloarthropathies. In: Hunder G, ed. *Atlas of Rheumatology.* Philadelphia: Current Medicine. 2005;: p. 151-180.
21. de Winter JJ et al. Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographical axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: p. 196.
22. Thorne JE, Suhler E, Skup M et al. Prevalence of non-infectious uveitis in the United States: a claims-based analysis. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(11): p. 1237-1245.
23. Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brézin AP. Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology.* 2004; 111(4): p. 802-809.
24. Ignacio Gómez-García, María Lourdes Ladehesa-Pineda, María Ángeles Puche-Larrubia, Rafaela Ortega-Castro, Pilar Font-Ugalde, Verónica Pérez-Guijo, Alejandro Escudero-Contreras, Gonzalo Diaz-Villalón, Clementina López-Medina, Eduardo Collantes-Estévez. Uveitis as the first symptom in spondyloarthritis and its association with the evolution of the disease. Results from the REGISPONSER registry. *Joint Bone Spine.* 2021; 88(3): p. 105136.
25. Martin Rudwaleit, Dominique Baeten. Ankylosing spondylitis and bowel disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20(3): p. 451-71.

26. Costello ME, Ciccia F, Willner D, et al. Brief Report: intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(3): p. 686-691.
27. Lavie F, Salliot C, Dernis E et al. Prognosis and follow-up of psoriatic arthritis with peripheral joint involvement: development of recommendations for clinical practice based on published evidence and expert opinion. *Jt Bone Spine.* 2009; 76(5): p. 540-546.
28. López-Medina C, Moltó A. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of axial spondyloarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2018; 32(2): p. 241-253.
29. Dean LE, Jones GT, Macdonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2014; 53(4): p. 650-657.
30. Webers C, Essers I, Ramiro S, et al. Gender-attributable differences in outcome of ankylosing spondylitis: longterm results from the Outcome in Ankylosing Spondylitis International Study. *Rheumatology.* 2016; 55(3): p. 419-428.
31. Collantes E, Zarco P, Munoz E, et al. Disease pattern of spondyloarthropathies in Spain: description of the first national registry (REGISPONSER) extended report. *Rheumatology.* 2007; 46(8): p. 1309-1315.
32. Ciurea A, Scherer A, Weber U, et al. Age at symptom onset in ankylosing spondylitis: is there a gender difference? *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(10): p. 1908-1910.
33. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet.* 1973; 1(7809): p. 904–907.
34. Caffrey MF, James DC. Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature.* 1973; 242(5393): p. 121.
35. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973; 288(14): p. 704–706.

36. Mark C Hwang, Lauren Ridley, John D Reveille. Ankylosing spondylitis risk factors: a systematic literature review. *Clin Rheumatol*. 2021; Online ahead of print.
37. Ramiro S, Landewé R, van Tubergen A, et al. Lifestyle factors may modify the effect of disease activity on radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a longitudinal analysis. *RMD Open*. 2015; 1: p. e000153.
38. Geirsson AJ, Kristjansson K, Gudbjornsson B. A strong familiarity of ankylosing spondylitis through several generations. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(7): p. 1346-1348.
39. Lindstrom U, Exarchou S, Lie E, et al. Childhood hospitalisation with infections and later development of ankylosing spondylitis: a national case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18(1): p. 240.
40. Jacques P, Lambrecht S, Verheugen E, et al. Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(2): p. 437-445.
41. Dennis McGonagle, Rebecca C Thomas, Georg Schett. Spondyloarthritis: may the force be with you? *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(2): p. 321-323.
42. Thorarensen SM, Lu N, Ogdie A, Gelfand JM, Choi HK, Love TJ. Physical trauma recorded in primary care is associated with the onset of psoriatic arthritis among patients with psoriasis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(3): p. 521-525.
43. Ward MM, Weisman MH, Davis Jr JC, Reveille JD. Risk factors for functional limitations in patients with long-standing ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2005; 53(5): p. 710-717.
44. Elena Nikiphorou, Sofia Ramiro, Alexandre Sepriano, Adeline Ruysen-Witrand, Robert B M Landewé, Désirée van der Heijde. Do Smoking and Socioeconomic Factors Influence Imaging Outcomes in Axial Spondyloarthritis? Five-Year Data From the DESIR Cohort. *Arthritis Rheumatol*. 2020; 72(11): p. 1855-1862.
45. Sizheng Steven Zhao, Kazuki Yoshida, Gareth T Jones, David M Hughes, Stephen J Duffield, Sara K Tedeschi et al. Smoking status and cause-specific discontinuation of

- tumour necrosis factor inhibitors in axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2019; 21(1): p. 177.
46. Sizheng Steven Zhao, Nicola J Goodson, Selina Robertson, Karl Gaffney. Smoking in spondyloarthritis: unravelling the complexities. *Rheumatology (Oxford).* 2020; 59(7): p. 1472-1481.
 47. Costantino F, Zeboulon N, Said-Nahal R, Breban M. Radiographic sacroiliitis develops predictably over time in a cohort of familial spondyloarthritis followed longitudinally. *Rheumatology.* 2017; 56(5): p. 811-817.
 48. Jean W Liew, Sofia Ramiro, Lianne S Gensler. Cardiovascular morbidity and mortality in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018; 32(3): p. 369-389.
 49. Clément Prati, Pascal Claudepierre, Thao Pham, Daniel Wendling. Mortality in spondylarthritis. *Joint Bone Spine.* 2011; 78(5): p. 466-70.
 50. Emilio Andres Buschiazzo, Emilce Edith Schneeberger, Fernando Andres Sommerfleck, Cesar Ledesma, Gustavo Citera. Mortality in patients with ankylosing spondylitis in Argentina. *Clin Rheumatol.* 2016; 35(9): p. 2229-33.
 51. Bakland G, Gran JT, Nossent JC. Increased mortality in ankylosing spondylitis is related to disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(11): p. 1921-1925.
 52. Exarchou S, Lie E, Lindstrom U, et al. Mortality in ankylosing spondylitis: results from a nationwide population-based study. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(8): p. 1466–1472.
 53. Haroon NN, Paterson JM, Li P, Inman RD, Haroon N. Patients with ankylosing spondylitis have increased cardiovascular and cerebrovascular mortality: a population-based study. *Ann Intern Med.* 2015; 163(6): p. 409-416.
 54. Wysham KD, Murray SG, Hills N, Yelin E, Gensler LS. Cervical spinal fracture and other diagnoses associated with mortality in hospitalized ankylosing spondylitis patients. *Arthritis Care Res.* 2017; 69(2): p. 271-277.

55. R. Myllykangas-Luosujärvi, K. Aho, K. Lehtinen, H. Kautiainen, M. Hakala. Increased incidence of alcohol-related deaths from accidents and violence in subjects with ankylosing spondylitis. *British Journal of Rheumatology*. 1998; 37: p. 688-690.
56. James, W. H. The rates of alcohol-related deaths from accidents and violence in subjects with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999; 38(1): p. 91.
57. de Blecourt J, Polman A, de Blecourt-Meindersma T. Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1961; 20: p. 215-223.
58. Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 59(11): p. 883-886.
59. Matthew A. Brown, Huji Xu, Zhixiu Li. Genetics and the axial spondyloarthritis spectrum. *Rheumatology*. 2020; 59: p. iv58–iv66.
60. Lawlor DA, Warren E, Taylor P, Parham P. Gorilla class I major histocompatibility complex alleles: comparison to human and chimpanzee class I. *J Exp Med*. 1991; 174(6): p. 1491-1509.
61. Tanigaki N, Fruci D, Vigneti E, et al. The peptide binding specificity of HLA-B27 subtypes. *Immunogenetics*. 1994; 40: p. 192–198.
62. Cortes A, Pulit SI, Leo PJ et al. Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nat Commun*. 2015; 6: p. 7146.
63. Kim K, Bang SY, Lee S et al. An HLA-C aminoacid variant in addition to HLA-B27 confers risk for ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: p. 342.
64. Amroun H, Djoudi H, Busson M, et al. Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. *Hum Immunol*. 2005; 66(10): p. 1057-1061.

65. N Tsuchiya, M Shiota, S Moriyama, A Ogawa, M Komatsu-Wakui, H Mitsui, D E Geraghty, K Tokunaga. MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(1): p. 68-73.
66. L Ricci-Vitiani, A Vacca, I Potolicchio, R Scarpa, P Bitti, G Sebastiani, G Passiu, A Mathieu, R Sorrentino. MICA gene triplet repeat polymorphism in patients with HLA-B27 positive and negative ankylosing spondylitis from Sardinia. *J Rheumatol.* 2000; 27(9): p. 2193-7.
67. B Suárez-Alvarez, A López-Vázquez, J M Baltar, F Ortega, C López-Larrea. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant.* 2009; 9(2): p. 251-7.
68. Yizhou Zou, Fariba Mirbaha, Ana Lazaro, Yanzheng Zhang, Bhavna Lavingia, Peter Stastny. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol.* 2002; 63(1): p. 30-9.
69. Zhou X, Wang J, Zou H et al. MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(8): p. 1552-1557.
70. Goyette P, Boucher G, Mallon D et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet.* 2015; 47(2): p. 172-179.
71. Robinson PC, Claushuis TA, Cortes A et al. Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(1): p. 140-151.
72. Diaz-Pena R, Aransay AM, Bruges-Armas J et al. Fine mapping of a major histocompatibility complex in ankylosing spondylitis: association of the HLA-DPA1 and HLA DPB1 regions. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(11): p. 3305-3312.
73. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, Cortes A, Bethune J, Han B et al. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat Genet.* 2016; 48(5): p. 510-8.

74. Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42(2): p. 123-7.
75. Consortium, Wellcome Trust Case Control; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 2007; 39(11): p. 1329-37.
76. Yong Ni, Chengrui Jiang. Identification of potential target genes for ankylosing spondylitis treatment. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(8): p. e9760.
77. Hao Zhao, Dan Wang, Deyu Fu, Luan Xue. Predicting the potential ankylosing spondylitis-related genes utilizing bioinformatics approaches. *Rheumatol Int.* 2015; 35(6): p. 973-9.
78. Roberts AR, Vecellio M, Chen L, et al. An ankylosing spondylitis-associated genetic variant in the IL-23R-IL12RB2 intergenic region modulates enhancer activity and is associated with increased Th1-cell differentiation. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(12): p. 2150-2156.
79. van der Heijde, Deodhar A, Wei JC, et al. Tofacitinib in patients with ankylosing spondylitis: a phase II, 16-week, randomised, placebo-controlled, dose-ranging study. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(8): p. 1340-1347.
80. Calliope A. Dendrou, Adrian Cortes, Lydia Shipman, Hayley G. Evans, Kathrine E. Attfield, Luke Jostins, Thomas Barber et al. Resolving TYK2 locus genotype-to-phenotype differences in autoimmunity. *Sci Transl Med.* 2016; 8(363): p. 363ra149.
81. Julie A Osgood, Julian C Knight. Translating GWAS in rheumatic disease: approaches to establishing mechanism and function for genetic associations with ankylosing spondylitis. *Brief Funct Genomics.* 2018; 17(5): p. 308–318.
82. Tsui FW, Haroon N, Reveille JD, et al. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(4): p. 733-736.

83. Takayuki Kanaseki, Nicolas Blanchard, Gianna Elena Hammer, Federico Gonzalez, Nilabh Shastri. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity*. 2006; 25(5): p. 795-806.
84. Kenna TJ, Robinson PC, Haroon N. Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxf)*. 2015; 54(9): p. 1549-1556.
85. Wienholz BL, Karetka MS, Moarefi AH, Gordon CA, Ginno PA, Chedin F. DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. *PLoS Genet*. 2010; 6(9): p. e1001106.
86. Breban M, Beaufrère M, Glatigny S. The microbiome in spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2019; 33(6): p. 101495.
87. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, Furet JP, Sokol H. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(9): p. 1614-1622.
88. George E Fragoulis, Christina Liava, Dimitrios Daoussis, Euangelos Akriviadis, Alexandros Garyfallos, and Theodoros Dimitroulas. Inflammatory bowel diseases and spondyloarthropathies: From pathogenesis to treatment. *World J Gastroenterol*. 2019; 25(18): p. 2162–2176.
89. Mariagrazia Lorenzin, Francesca Ometto, Augusta Ortolan, Mara Felicetti, Marta Favero, Andrea Doria, and Roberta Ramonda. An update on serum biomarkers to assess axial spondyloarthritis and to guide treatment decision. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2020; 12: p. 1759720X20934277.
90. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A et al. Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(6): p. 1123-1132.
91. Mundwiler, M.L., Mei, L., Landers, C.J. et al. Inflammatory bowel disease serologies in ankylosing spondylitis patients: a pilot study. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11: p. R177.

92. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W, Li JM. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012; 7(4): p. e31000.
93. Wang C, Liao Q, Hu Y, Zhong D. T lymphocyte subset imbalances in patients contribute to ankylosing spondylitis. *Exp Ther Med*. 2015; 9(1): p. 250-256.
94. Wu Y, Ren M, Yang R, Liang X, Ma Y, Tang Y, Huang L, Ye J, Chen K, Wang P, Shen H. Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13(1): p. R29.
95. Ugan Y, Naziroglu M, Sahin M, Aykur M. Anti-tumor necrosis factor alpha (infliximab) attenuates apoptosis, oxidative stress, and calcium ion entry through modulation of Cation channels in neutrophils of patients with Ankylosing spondylitis. *J Membr Biol*. 2016; 249(4): p. 437–47.
96. Boyraz I, Koc B, Boyaci A, Tutoglu A, Sarman H, Ozkan H. Ratio of neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte in patient with ankylosing spondylitis that are treating with anti-TNF. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(9): p. 2912-2915.
97. Hahn S, Giaglis S, Chowdhury CS, Hosli I, Hasler P. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin Immunopathol*. 2013; 35(4): p. 439–53.
98. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): p. 1532-1535.
99. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007; 176(2): p. 231–41.
100. Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*. 2010; 36.

101. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS One*. 2014; 9(5): p. e97088.
102. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010; 191(3): p. 677–91.
103. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, Hu J, Wang Y, Wagner DD. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(21): p. 8674–9.
104. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009; 184(2): p. 205–13.
105. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012; 7(10): p. e48111.
106. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Jimenez-Gomez Y, Arias-de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC et al. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun*. 2017; 82: p. 31-40.
107. Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*. 2016; 126(5): p. 1612–20.
108. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(21): p. 9813–8.
109. Ritika Khandpur, Carmelo Carmona-Rivera, Anuradha Vivekanandan-Giri, Alison Gizinski, Srilakshmi Yalavarthi, Jason S Knight et al. NETs are a source of citrullinated

- autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013; 5(178): p. 178ra40.
110. Granger V, Peyneau M, Chollet-Martin S, de Chaisemartin L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front Immunol.* 2019; 10: p. 2824.
 111. Joachim Sieper, Jürgen Braun, Maxime Dougados and Dominique Baeten. Axial spondyloarthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015; 1: p. 15013.
 112. Braun, J. et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: p. 499-505.
 113. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F. & Kollias, G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* 1999; 10: p. 387–398.
 114. Armaka, M. et al. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. Armaka, M. et al. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med.* 2008; 205: p. 331-337.
 115. Siba P Raychaudhuri, Smriti K Raychaudhuri. IL-23/IL-17 axis in spondyloarthritis- bench to bedside. *Clin Rheumatol.* 2016; 35(6): p. 1437-41.
 116. Ellen M Gravallese, Georg Schett. Effects of the IL-23-IL-17 pathway on bone in spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018; 14(11): p. 631-640.
 117. Razawy W, van Driel M, Lubberts E. The role of IL-23 receptor signaling in inflammation-mediated erosive autoimmune arthritis and bone remodeling. *Eur J Immunol.* 2018; 48: p. 220-229.
 118. Rik J Lories, Iain B McInnes. Primed for inflammation: enthesis-resident T cells. *Nat Med.* 2012; 18(7): p. 1018-9.

119. Mei Y., Pan F., Gao J., Ge R., Duan Z., Zeng Z., Liao F., Xia G., Wang S., Xu S., et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2010; 30: p. 269–273.
120. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, et al. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gammat+CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med.* 2012; 18: p. 1069-1076.
121. Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell.* 2017; 169(6): p. 985-999.
122. Diarra D, Stolina M, Polzer K et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007; 13(2): p. 156-163.
123. Xiang Li, Jianru Wang, Zhongping Zhan, Sibe Li, Zhaomin Zheng, Taiping Wang, Kuibo Zhang, Hehai Pan, Zemin Li, Nu Zhang, and Hui Liu. Inflammation Intensity–Dependent Expression of Osteoinductive Wnt Proteins Is Critical for Ectopic New Bone Formation in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70(7): p. 1056-1070.
124. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, et al. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(3): p. 592-597.
125. Lories RJ, Matthys P, de Vlam K, Derese I, Luyten FP. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprosperiostitis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(5): p. 595-598.
126. Ruiz-Heiland G, Horn A, Zerr P, et al. Blockade of the hedgehog pathway inhibits osteophyte formation in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: p. 400-407.
127. *J B. Rheumatology.* 2019; 58.
128. Maksymowych, Walter P. Biomarkers for Diagnosis of Axial Spondyloarthritis, Disease Activity, Prognosis, and Prediction of Response to Therapy. *Front Immunol.* 2019; 10: p. 305.

129. Wei C, Zhang H, Wei C, Mao Y. Correlation of the expression of miR-146a in peripheral blood mononuclear cells of patients with ankylosing spondylitis and inflammatory factors. *Exp Ther Med*. 2017; 14: p. 5027–31.
130. Hua H, Fei Du, Shizhan Zhang, Weiguo Zhang. Serum calprotectin correlates with risk and disease severity of ankylosing spondylitis and its change during first month might predict favorable response to treatment. *Mod Rheumatol*. 2019; 29(5): p. 836-842.
131. Inman RD, Baraliakos X, Hermann KGA, Braun J, Deodhar A, van der Heijde D, et al. Serum biomarkers and changes in clinical/MRI evidence of golimumab-treated patients with ankylosing spondylitis: results of the randomized, placebo-controlled GO-RAISE study. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18(R304).
132. Siebuhr AS, van der Heijde D, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Landewé R, van Tubergen A, et al. Is radiographic progression in radiographic axial spondyloarthritis related to matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix? *RMD Open*. 2018; 4: p. e000648.
133. Ravn P, Clemmesen B, Christiansen C. Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Bone*. 1999; 24(3): p. 237-44.
134. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, et al. Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70: p. 1369–74.
135. Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Haibel H, Rudwaleit M, et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: p. 1746–8.
136. Poddubnyy D, Conrad K, Haibel H, Syrbe U, Appel H, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(12): p. 2137-43.

137. Syrbe U, Callhoff J, Conrad K, Poddubnyy D, Haibel H, Junker S, et al. Serum adipokine levels in patients with ankylosing spondylitis and their relationship to clinical parameters and radiographic spinal progression. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: p. 678–85.
138. Hartl A, Sieper J, Syrbe U, Listing J, Hermann KG, Rudwaleit M, Poddubnyy D. Serum levels of leptin and high molecular weight adiponectin are inversely associated with radiographic spinal progression in patients with ankylosing spondylitis: results from the ENRADAS trial. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19(1): p. 140.
139. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing spondylitis disease activity index. *J Rheumatol.* 1994; 21(12): p. 2286–91.
140. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Varas R, et al. Assessment in AS' international working group; European League against Rheumatism. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: p. 442-452.
141. Lukas C, Landewe R, Sieper J et al. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: p. 18-24.
142. Pedersen SJ, Sorensen IJ, Hermann KG, et al. Responsiveness of the Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) and clinical and MRI measures of disease activity in a 1-year follow-up study of patients with axial spondyloarthritis treated with tumour necrosis factor alpha inhibitors. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: p. 1065–1071.
143. Nas K, Yildirim K, Cevik R, et al. Discrimination ability of ASDAS estimating disease activity status in patients with ankylosing spondylitis. *Int J Rheum Dis.* 2010; 13: p. 240–245.
144. Aydin SZ, Can M, Atagunduz P, et al. Active disease requiring TNF-alpha antagonist therapy can be well discriminated with different ASDAS sets: a prospective, follow-up of disease activity assessment in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010; 28: p. 752–755.

145. I. Concepcion Aranda-Valera, Juan L. Garrido-Castro, Lourdes Ladehesa-Pineda, Janitzia Vazquez-Mellado, Pedro Zarco, Xavier Juanola, Cristina Gonzalez-Navas, Pilar Font-Ugalde, M. Carmen Castro-Villegas. How to calculate the ASDAS based on C-reactive protein without individual questions from the BASDAI: the BASDAI- based ASDAS formula. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 59(7): p. 1545-1549.
146. López-Medina C, Schiotis RE, Font-Ugalde P, Castro-Villegas MC, Calvo-Gutiérrez J, Ortega-Castro R, Jiménez-Gasco R, Escudero-Contreras A, Collantes-Estévez E; REGISPONSER Working Group. Assessment of Fatigue in Spondyloarthritis and Its Association with Disease Activity. *J Rheumatol*. 2016; 43(4): p. 751-7.
147. Braun J, Brandt J, Listing J, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359(9313): p. 1187–1193.
148. Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, et al. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: p. 127–132.
149. Clegg DO, Reda DJ, Weisman MH, et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of ankylosing spondylitis. A department of veterans affairs cooperative study. *Arthritis Rheum*. 1996; 39: p. 2004–12.
150. Machado P, Landewé R, Braun J, et al. A stratified model for health outcomes in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70: p. 1758–1764.
151. Landewé R, Dougados M, Mielants H, van der Tempel H, van der Heijde D. Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: p. 863–867.
152. Calin A, Garrett S, Whitelock H, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol*. 1994; 21(12): p. 2281–2285.
153. Dougados M, Gueguen A, Nakache JP, Nguyen M, Mery C, Amor B. Evaluation of a functional index and an articular index in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 1988; 15: p. 302–307.

154. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garrett SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS). The Bath AS metrology index. *J Rheumatol*. 1994; 21: p. 1694-1698.
155. Juan L. Garrido-Castro, Rafael Medina-Carnicer, Ruxandra Schiottis, Alfonso M. Galisteo, Eduardo Collantes-Estevez, Cristina Gonzalez-Navas. Assessment of spinal mobility in ankylosing spondylitis using a video-based motion capture system. *Man Ther*. 2012; 17(5): p. 422-426.
156. Puche Larrubia MÁ, Castro Villegas MC, Ortega Castro R, Garrido-Castro JL, Font-Ugalde P, Escudero-Contreras A, Ladehesa-Pineda L, Gómez García I, Collantes-Estévez E, López Medina C. ASAS Health Index in patients with spondyloarthritis and its association with disease activity and disease burden including fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol*. 2021; Online ahead of print.
157. Wanders AJ, Landewe RB, Spoorenberg A, et al. What is the most appropriate radiologic scoring method for ankylosing spondylitis? A comparison of the available methods based on the Outcome Measures in Rheumatology Clinical Trials filter. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: p. 2622-2632.
158. van der Heijde D, Braun J, Deodhar A, Baraliakos X, Landewé R, Richards HB, et al. Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58(3): p. 388-400.
159. Mandl P, Navarro-Compán V, Terslev L, et al. EULAR recommendations for the use of imaging in the diagnosis and management of spondyloarthritis in clinical practice. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74(7): p. 1327-1339.
160. Rudwaleit M, Jurik AG, Hermann KGA, et al. Defining active sacroiliitis on magnetic resonance imaging (MRI) for classification of axial spondyloarthritis: a consensual approach by the ASAS/OMERACT MRI Group. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: p. 1520–1527.
161. WP., Maksymowych. Imaging in axial spondyloarthritis: evaluation of inflammatory and structural changes. *Rheum Dis Clin N Am*. 2016; 42: p. 645–662.

162. S. Castañeda, M.T. Nurmohamed, M.A. González-Gay. Cardiovascular disease in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2016; 30: p. 851-869.
163. Benjamín Fernández-Gutiérrez, Pedro P Perrotti, Javier P Gisbert, Eugeni Domènech, Antonio Fernández-Nebro, Juan D Cañete, Carlos Ferrándiz, Jesús Tornero, Valle García-Sánchez, Julián Panés, Eduardo Fonseca, Francisco Blanco, Jesús Rodríguez-Moreno, Patr. Cardiovascular disease in immune-mediated inflammatory diseases: A cross-sectional analysis of 6 cohorts. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(26): p. e7308.
164. C Andrades, C Fuego, S Manrique-Arija, A Fernández-Nebro. Management of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Lupus*. 2017; 26(13): p. 1407-1419.
165. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76: p. 17-28.
166. Papagoras C, Voulgari PV and Drosos AA. Cardiovascular disease in spondyloarthritides. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020; 18(5): p. 473–487.
167. Maghraoui, Abdellah El. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur J Intern Med*. 2011; 22(6): p. 554-60.
168. Hiren Divecha, Naveed Sattar, Ann Rumley, Lynne Cherry, Gordon D O Lowe, Roger Sturrock. Cardiovascular risk parameters in men with ankylosing spondylitis in comparison with non-inflammatory control subjects: relevance of systemic inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(2): p. 171-6.
169. V P van Halm, J C van Denderen, M J L Peters, J W R Twisk, M van der Paardt, I E van der Horst-Bruinsma, R J van de Stadt, M H M T de Koning, B A C Dijkmans, M T Nurmohamed. Increased disease activity is associated with a deteriorated lipid profile in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(11): p. 1473-7.

170. Chenglong Han, Don W Robinson Jr, Monica V Hackett, L Clark Paramore, Kathy H Fraeman, Mohan V Bala. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2006; 33(11): p. 2167-72.
171. Wang K, Wang Y, Chu C, et al. Joint association of serum homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein with arterial stiffness in Chinese population: a 12-year longitudinal study. *Cardiology*. 2019; 144(1-2): p. 27-35.
172. Blaum C, Brunner FJ, Kröger F, et al. Modifiable lifestyle risk factors and C-reactive protein in patients with coronary artery disease: implications for an anti-inflammatory treatment target population. *Eur J Prev Cardiol*. 2019; 10.
173. Manejo de dislipemias en atención primaria. *Medicina de familia. SEMERGEN*. 2009; 35(S3): p. 1-57.
174. Bernard C. Rossier, Murielle Bochud, and Olivier Devuyst. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiology (Bethesda)*. 2017; 32(2): p. 112-125.
175. Astrid Petersmann, Dirk Müller-Wieland, Ulrich A Müller, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019; 127(S01): p. S1-S7.
176. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. [Online].
177. Engin, Atilla. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 960: p. 1-17.
178. Sonja Francula-Zaninovic, Iskra A Nola. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Cardiol Rev*. 2018; 14(3): p. 153-163.
179. Jonathan C. Brown, Thomas E. Gerhardt, Edward Kwon. Risk Factors For Coronary Artery Disease. *StatPearls [Internet]*. 2020.

180. D'Agostino RB Sr, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P; Group., CHD Risk Prediction. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA*. 2001; 286(2): p. 180-7.
181. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016; 252: p. 207-274.
182. Park SH, Sohn IS, Joe BH, et al. Early cardiac valvular changes in ankylosing spondylitis: a transesophageal echocardiography study. *J Cardiovasc Ultrasound*. 2012; 20: p. 30-36.
183. Forsblad-d'Elia H, Wallberg H, Klingberg E, et al. Cardiac conduction system abnormalities in ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *BMC Musculoskeletal Dis*. 2013; 14: p. 237.
184. Gould BA, Turner J, Keeling DH, Hickling P, Marshall AJ. Myocardial dysfunction in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1992; 51: p. 227-232.
185. Han C, Robinson DW Jr, Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2006; 33(11): p. 2167-72.
186. González-Gay MA, Rueda-Gotor J. Atherosclerosis in ankylosing spondylitis: clinical implications. *Pol Arch Intern Med*. 2018; 128(7-8): p. 409-410.
187. Cece H, Yazgan P, Karakas E, Karakas O, Demirkol A, Toru I, Aksoy N. Carotid intima-media thickness and paraoxonase activity in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med*. 2011; 34(4): p. E225.
188. Bodnár N, Kerekes G, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Némethné ZG, Szegedi G, Shoenfeld Y, Sipka S, Soltész P, Szekanecz Z, Szántó S. Assessment of subclinical

- vascular disease associated with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2011; 38(4): p. 723-9.
189. Capkin E, Kiris A, Karkucak M, Durmus I, Gokmen F, Cansu A, Tosun M, Ayar A. Investigation of effects of different treatment modalities on structural and functional vessel wall properties in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine.* 2011; 78(4): p. 378-82.
190. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD et al. Systemic Inflammatory Response and Atherosclerosis: The Paradigm of Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sc.* 2018; 27(19): p. 7.
191. Giollo A, Dalbeni A, Cioffi G, Ognibeni F, Gatti D, Idolazzi L, Orsolini G, Minuz P, Rossini M, Fava C, Viapiana O. Factors associated with accelerated subclinical atherosclerosis in patients with spondyloarthritis without overt cardiovascular disease. *Clin Rheumatol.* 2017; 36(11): p. 2487-2495.
192. Berdal G, Halvorsen S, van der Heijde D, Mowe M, Dagfinrud H. Restrictive pulmonary function is more prevalent in patients with ankylosing spondylitis than in matched population controls and is associated with impaired spinal mobility: a comparative study. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(R19).
193. Rosenow E, Strimlan CV, Muhm JR, Ferguson RH. Pleuropulmonary manifestations of ankylosing spondylitis. *Mayo Clin Proc.* 1977; 52: p. 641–649.
194. Kiris A, Ozgocmen S, Kocakoc E, Ardicoglu O, Ogur E. Lung findings on high resolution CT in early ankylosing spondylitis. *Eur J Radiol.* 2003; 47: p. 71-76.
195. El-Maghraoui A, Chaouir S, Abid A, et al. Lung findings on thoracic high-resolution computed tomography in patients with ankylosing spondylitis. Correlations with disease duration, clinical findings and pulmonary function testing. *Clin Rheumatol.* 2004; 23: p. 123–128.
196. Ayhan-Ardic FF, Oken O, Yorgancioglu ZR, Ustun N, Gokharman FD. Pulmonary involvement in lifelong non-smoking patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis without respiratory symptoms. *Clin Rheumatol.* 2006; 25: p. 213–218.

197. Erb N, Karokis D, Delamere JP, Cushley MJ, Kitas GD. Obstructive sleep apnoea as a cause of fatigue in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: p. 183–184.
198. Solak Ö, Fidan F, DüNDAR Ü, et al. The prevalence of obstructive sleep apnoea syndrome in ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology.* 2009; 48: p. 433–435.
199. Levy AR, Szabo SM, Rao SR, Cifaldi M, Maksymowych WP. Estimating the occurrence of renal complications among persons with ankylosing spondylitis. *Arthritis Care Res.* 2014; 66: p. 440-445.
200. Antonio Fernández-Nebro, Eva Tomero, Vera Ortiz-Santamaría, María Carmen Castro, Alejandro Olivé, Manuel de Haro, Rosa García Portales, María Victoria González-Mari, Armando Laffón, Rosario García-Vicuña. Treatment of rheumatic inflammatory disease in 25 patients with secondary amyloidosis using tumor necrosis factor alpha antagonists. *Am J Med.* 2005; 118(5): p. 552-6.
201. Lee SH, Lee EJ, Chung SW, et al. Renal involvement in ankylosing spondylitis: prevalence, pathology, response to TNF- α blocker. *Rheumatol Int.* 2013; 33: p. 1689-1692.
202. Shih MT, Tang SH, Cha TL, Wu ST, Chiang JH, Chen WC. The risk of nephrolithiasis among patients with ankylosing spondylitis: a population-based cohort study. *Arch Rheumatol.* 2016; 31: p. 346–352.
203. Geirsson AJ, Eyjolfsdottir H, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Gudbjornsson B. Prevalence and clinical characteristics of ankylosing spondylitis in Iceland - a nationwide study. *Clin Exp Rheumatol.* 2010; 28: p. 333-340.
204. Lange U, Berliner M, Weidner W, Schiefer HG, Schmidt KL, Federlin K. Ankylosing spondylitis and urogenital infection: diagnosis of urologic infection and correlation with rheumatologic findings. *Z Rheumatol.* 1996; 55: p. 249–255.
205. Ozgocmen S, Kocakoc E, Kiris A, Ardicoglu A, Ardicoglu O. Incidence of varicoceles in patients with ankylosing spondylitis evaluated by physical examination and color duplex sonography. *Urology.* 2002; 59: p. 919-922.

206. Fan D, Liu L, Ding N, et al. Male sexual dysfunction and ankylosing spondylitis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*. 2015; 42: p. 252–257.
207. Demir SE, Rezvani A, Ok S. Assessment of sexual functions in female patients with ankylosing spondylitis compared with healthy controls. *Rheumatol Int*. 2013; 33: p. 57–63.
208. Jakobsson GL, Stephansson O, Askling J, Jacobsson LT. Pregnancy outcomes in patients with ankylosing spondylitis: a nationwide register study. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75: p. 1838–1842.
209. Will R, Bhalla A, Palmer R, Ring F, Calin A. Osteoporosis in early ankylosing spondylitis: a primary pathological event? *Lancet*. 1989; 334: p. 1483–1485.
210. Van der Weijden MA, Van Denderen JC, Lems WF, Heymans MW, Dijkmans BA, van der Horst-Bruinsma IE. Low bone mineral density is related to male gender and decreased functional capacity in early spondylarthropathies. *Clin Rheumatol*. 2011; 30: p. 497–503.
211. Grazio S, Kusić Z, Cvijetić S, et al. Relationship of bone mineral density with disease activity and functional ability in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2012; 32: p. 2801–2808.
212. Wang DM, Zeng QY, Chen SB, Gong Y, Hou ZD, Xiao ZY. Prevalence and risk factors of osteoporosis in patients with ankylosing spondylitis: a 5-year follow-up study of 504 cases. *Clin Exp Rheumatol*. 2015; 33: p. 465–470.
213. Briot K, Durnez A, Paternotte S, Miceli-Richard C, Dougados M, Roux C. Bone oedema on MRI is highly associated with low bone mineral density in patients with early inflammatory back pain: results from the DESIR cohort. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72: p. 1914–1919.
214. Briot K, Geusens P, Bultink IE, Lems WF, Roux C. Inflammatory diseases and bone fragility. *Osteoporos Int*. 2017; 28: p. 3301–3314.

215. Ulu MA, Batmaz İ., Dilek B, Çevik R. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures and related factors in patients with ankylosing spondylitis. *Chin Med J (Engl)*. 2014; 127: p. 2740–2747.
216. Geusens P, De Winter L, Quaden D, et al. The prevalence of vertebral fractures in spondyloarthritis: relation to disease characteristics, bone mineral density, syndesmophytes and history of back pain and trauma. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: p. 294.
217. Muñoz-Ortego J, Vestergaard P, Rubio JB, et al. Ankylosing spondylitis is associated with an increased risk of vertebral and nonvertebral clinical fractures: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res*. 2014; 29: p. 1770–1776.
218. Rustagi T, Drazin D, Oner C, et al. Fractures in spinal ankylosing disorders: a narrative review of disease and injury types, treatment techniques, and outcomes. *J Orthop Trauma*. 2017; 31: p. S57–S74.
219. Ramos-Remus C, Gomez-Vargas A, Guzman-Guzman JL, et al. Frequency of atlantoaxial subluxation and neurologic involvement in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 1995; 22: p. 2120–2125.
220. Ahn NU, Ahn UM, Nallamshetty L, et al. Cauda equina syndrome in ankylosing spondylitis (the CES-AS syndrome): meta-analysis of outcomes after medical and surgical treatments. *J Spinal Disord*. 2001; 14: p. 427–433.
221. Laura Cano-García, Natalia Mena-Vázquez, Sara Manrique Arijá, María Dolores Hernández-Sánchez, Rocío Segura-Ruiz, Carmen Domínguez-Quesada, Antonio Fernández-Nebro. Psychological factors associated with sleep disorders in patients with axial spondyloarthritis or psoriatic arthritis: A multicenter cross-sectional observational study. *J Clin Nurs*. 2021; 30: p. 266-275.
222. Meesters JJ, Bremander A, Bergman S, Petersson IF, Turkiewicz A, Englund M. The risk for depression in patients with ankylosing spondylitis: a population-based cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16: p. 418.

223. Almodóvar R, Carmona L, Zarco P, et al. Fibromyalgia in patients with ankylosing spondylitis: prevalence and utility of the measures of activity, function and radiological damage. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28: p. S33–S39.
224. Salaffi F, De Angelis R, Carotti M, Gutierrez M, Sarzi- Puttini P, Atzeni F. Fibromyalgia in patients with axial spondyloarthritis: epidemiological profile and effect on measures of disease activity. *Rheumatol Int*. 2014; 34: p. 1103–1110.
225. van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, Regel A, Ciurea A, Dagfinrud H, Dougados M, van Gaalen F, Géher P, van der Horst-Bruinsma I, Inman RD, Jongkees M, Kiltz U, Kvien TK, Machado PM, Marzo-Ortega H, Molto A, Na. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(6): p. 978-991.
226. Ward MM, Deodhar A, Akl EA, et al. American College of Rheumatology/spondylitis association of America/ spondyloarthritis research and treatment network 2015 recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(2): p. 282–298.
227. Passalent LA, Ozgocmen S. Non-pharmacological management in axial spondyloarthritis. In: Robert I, Joachim S, eds. *Oxford Textbook of Axial Spondyloarthritis*. Oxford: Oxford University Press. 2016;; p. 175–187.
228. Ward MM, Deodhar A, Akl EA, et al. American College of rheumatology/spondylitis association of America/ spondyloarthritis research and treatment network 2015 recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68: p. 282-298.
229. Coxib, traditional NTC, Bhala N, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2013; 382: p. 769–779.
230. Roubille C, Richer V, Starnino T, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids

- on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74: p. 480-489.
231. Haibel H, Fendler C, Listing J, Callhoff J, Braun J, Sieper J. Efficacy of oral prednisolone in active ankylosing spondylitis: results of a double-blind, randomised, placebocontrolled short-term trial. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73: p. 243-246.
232. Peters ND, Ejstrup L. Intravenous methylprednisolone pulse therapy in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 1992; 21(3): p. 134-8.
233. Braun J, Pavelka K, Ramos-Remus C, et al. Clinical efficacy of etanercept versus sulfasalazine in ankylosing spondylitis subjects with peripheral joint involvement. *J Rheumatol.* 2012; 39: p. 836-840.
234. van der Heijde D, Deodhar A, Wei JC, et al. Tofacitinib in patients with ankylosing spondylitis: a phase II, 16-week, randomised, placebo-controlled, dose-ranging study. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76: p. 1340–1347.
235. van der Heijde D, Song IH, Pangan AL, Deodhar A, van den Bosch F, Maksymowych WP, Kim TH, Kishimoto M, Everding A, Sui Y, Wang X, Chu AD, Sieper J. Efficacy and safety of upadacitinib in patients with active ankylosing spondylitis (SELECT-AXIS 1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2/3 trial. *Lancet.* 2019; 394(10214): p. 2108-2117.
236. Pathan E, Abraham S, Van Rossen E, et al. Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: p. 1475–1480.
237. Baraliakos X, Haibel H, Listing J, Sieper J, Braun J. Continuous long-term anti-TNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(4): p. 710-715.
238. Haroon N, Inman RD, Learch TJ, et al. The impact of tumor necrosis factor alpha inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(10): p. 2645-2654.

239. Maas F, Arends S, Brouwer E, et al. Reduction in spinal radiographic progression in ankylosing spondylitis patients receiving prolonged treatment with TNF-alpha inhibitors. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017; 69(7): p. 1011-1019.
240. Godfrey MS, Friedman LN. Tuberculosis and Biologic Therapies: Anti-Tumor Necrosis Factor- α and Beyond. *Clin Chest Med*. 2019; 40(4): p. 721-739.
241. Westhovens I, Lories RJ, Westhovens R, Verschueren P, de Vlam K. Anti-TNF therapy and malignancy in spondyloarthritis in the Leuven spondyloarthritis biologics cohort (BIOSPAR). *Clin Exp Rheumatol*. 2014; 32(1): p. 71-6.
242. Braun J, Baraliakos X, Deodhar A, et al. Effect of secukinumab on clinical and radiographic outcomes in ankylosing spondylitis: 2-year results from the randomised phase III MEASURE 1 study. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(6): p. 1070-1077.
243. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(1): p. 127-9.
244. Ruiz-Limón P ORAdIRIAAMPSCJGYPSEFPRVDFGCEEECALPCBN. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res*. 2017; 183: p. 87-103.
245. Braun J, Pham T, Sieper J, Davis J, van der Linden S, Dougados M, van der Heijde D. International ASAS consensus statement for the use of antitumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(9): p. 817-824.
246. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Naqvi T, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaud E, Woo KS. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 34(4): p. 290-6.

247. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1999; 340: p. 14-22.
248. Bjornsdottir H, Welin A, Michaelsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, Sundqvist M, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2015; 89: p. 1024–35.
249. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010; 207(9): p. 1853–62.
250. Chary López-Pedreira, Nuria Barbarroja, Yolanda Jimenez-Gomez, Eduardo Collantes-Estevez, Ma Angeles Aguirre, Ma Jose Cuadrado. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with anti-phospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology (Oxford).* 2016; 55(12): p. 2096-2108.
251. Ronneberger M, Schett G. Pathophysiology of spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2011; 13(5): p. 416–20.
252. Pamir Atagunduz, Heiner Appel, Wolfgang Kuon, Peihua Wu, Andreas Thiel, Peter-Michael Kloetzel, Joachim Sieper. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(3): p. 892-901.
253. C T Pease, M Fennell, D A Brewerton. Polymorphonuclear leucocyte motility in men with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1989; 48(1): p. 35-41.
254. C Wright, M Edelman, K diGleria, S Kollnberger, H Kramer, S McGowan, K McHugh, S Taylor, B Kessler, P Bowness. Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the ubiquitin proteasome pathway. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(10): p. 1626-32.

255. C. Nathan. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3): p. 173-82.
256. Couto D, Ribeiro D, Freitas M, Gomes A, Lima JL, Fernandes E. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species by the prodrug sulfasalazine and its metabolites 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine. *Redox Rep.* 2010; 15(6): p. 259–67.
257. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(3): p. R122.
258. Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2016; 7: p. 485.
259. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: A distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(4): p. 455- 463.
260. Leadbetter EA, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002; 416: p. 603–607.
261. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Jimenez-Gomez Y, Arias-de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, Rodriguez-Ariza A, Castro-Villegas MC, Ortega- Castro R, Segui P, Martinez C, Gonzalez-Conejero R, Rodriguez-Lopez S, Gonzalez-Reyes JA, Villalba JM, Colla. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun.* 2017; 82: p. 31-40.
262. Brandt J, Haibel H, Cornely D, Golder W, Gonzalez J, Reddig J, Thriene W, Sieper J, Braun J. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(6): p. 1346–52.
263. Brandt J, Haibel H, Sieper J, Reddig J, Braun J. Infliximab treatment of severe ankylosing spondylitis: one-year followup. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(12): p. 2936–7.

264. Brandt J, Khariouzov A, Listing J, Haibel H, Sorensen H, Grassnickel L, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Six-month results of a double-blind, placebocontrolled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(6): p. 1667–75.
265. M. Feldmann. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: p. 1-27.
266. Francois RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(6): p. 713–20.
267. J Braun, M Bollow, L Neure, E Seipelt, F Seyrekbasan, H Herbst, U Eggens, A Distler, J Sieper. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(4): p. 499-505.
268. J Brandt, H Haibel, D Cornely, W Golder, J Gonzalez, J Reddig, W Thriene, J Sieper, J Braun. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(6): p. 1346-52.
269. Collaboration”, “The Emerging Risk Factors. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375: p. 132–140.
270. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340(2): p. 115-26.
271. Carlos Gonzalez-Juanatey, Tomas R Vazquez-Rodriguez, Jose A Miranda-Filloy, Trinidad Dierssen, Ines Vaqueiro, Ricardo Blanco, Javier Martin, Javier Llorca, Miguel A Gonzalez-Gay. The high prevalence of subclinical atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis without clinically evident cardiovascular disease. *Medicine (Baltimore).* 2009; 88(6): p. 358-365.

272. Wafa Hamdi, Mouna Chelli Bouaziz, Imen Zouch, Mohamed Mehdi Ghannouchi, Manel Haouel, Mohamed Fethi Ladeb, Mohamed Montacer Kchir. Assessment of preclinical atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2012; 39(2): p. 322-6.
273. Hasan Cece, Pelin Yazgan, Ekrem Karakas, Omer Karakas, Ahmet Demirkol, Ismail Toru, Nurten Aksoy. Carotid intima-media thickness and paraoxonase activity in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med.* 2011; 34(4): p. E225.
274. Nóra Bodnár, György Kerekes, Ildikó Seres, György Paragh, János Kappelmayer, Zsuzsanna Gyurcsik Némethné, Gyula Szegedi, Yehuda Shoenfeld, Sándor Sipka, Pál Soltész, Zoltán Szekanecz, Sándor Szántó. Assessment of subclinical vascular disease associated with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2011; 38(4): p. 723-9.
275. I Moysakakis, E Gialafos, V A Vassiliou, K Boki, V Votteas, P P Sfikakis, G E Tzelepis. Myocardial performance and aortic elasticity are impaired in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2009; 38(3): p. 216-21.
276. Mike J L Peters, Izhar C van Eijk, Yvo M Smulders, Erik Serne, Ben A C Dijkmans, Irene E van der Horst-Bruinsma, Michael T Nurmohamed. Signs of accelerated preclinical atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2010; 37(1): p. 161-6.
277. Erhan Capkin, Abdulkadir Kiris, Murat Karkucak, Ismet Durmus, Ferhat Gokmen, Aysegul Cansu, Mehmet Tosun, Ahmet Ayar. Investigation of effects of different treatment modalities on structural and functional vessel wall properties in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine.* 2011; 78(4): p. 378-82.
278. Libby, Peter. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 2008; 121: p. (10 Suppl 1):S21-31.
279. Miguel A Gonzalez-Gay, Carlos Gonzalez-Juanatey, Javier Martin. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005; 35(1): p. 8-17.

280. Zhi-Hao Li, Wen-Fang Zhong, Yue-Bin Lv, Virginia Byers Kraus, Xiang Gao, Pei-Liang Chen, Qing-Mei Huang, Jin-Dong Ni, Xiao-Ming Shi, Chen Mao, Xian-Bo Wu. Associations of plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations with all-cause and cause-specific mortality among middle-aged and elderly individuals. *Immun Ageing*. 2019; 16(28).
281. Denis Poddubnyy, Hiltrun Haibel, Joachim Listing, Elisabeth Märker-Hermann, Henning Zeidler, Jürgen Braun, Joachim Sieper, Martin Rudwaleit. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(5): p. 1388-98.
282. Costantino S, Paneni F, Cosentino F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J Physiol*. 2016; 594(8): p. 2061-73.
283. Ramiro S, Stolwijk C, van Tubergen A, van der Heijde D, Dougados M, van den Bosch F. Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74: p. 52–59.
284. Liew JW, Ramiro S and Gensler LS. Cardiovascular morbidity and mortality in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018; 32: p. 369–389.
285. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, et al. Cigarette smoking has a dose-dependent impact on progression of structural damage in the spine in patients with axial spondyloarthritis: results from the GERman SPondyloarthritis Inception Cohort (GESPIC). *Ann Rheum Dis*. 2013; 72: p. 1430–1432.
286. Glintborg B, Højgaard P, Lund Hetland M, et al. Impact of tobacco smoking on response to tumor necrosis factor-alpha inhibitor treatment in patients with ankylosing spondylitis: results from the Danish nationwide DANBIO registry. *Rheumatology*. 2016; 55: p. 659–668.
287. Anna Moltó, Adrien Etcheto, Désirée van der Heijde, Robert Landewé, Filip van den Bosch, Wilson Bautista Molano et al. Prevalence of comorbidities and evaluation of

- their screening in spondyloarthritis: results of the international cross-sectional ASAS-COMOSPA study. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(6): p. 1016-23.
288. Bakirci S, Dabague J, Eder L, et al. The role of obesity on inflammation and damage in spondyloarthritis: a systematic literature review on body mass index and imaging. *Clin Exp Rheumatol.* 2020; 38: p. 144–148.
289. Atzeni F, Nucera V, Galloway J, et al. Cardiovascular risk in ankylosing spondylitis and the effect of anti-TNF drugs: a narrative review. *Expert Opin Biol Ther.* 2020; 20: p. 517–524.
290. López-Medina C, Jiménez-Gómez Y, Moltó A, Schiotis RE, Marzo-Ortega H, van Gaalen FA, et al. Cardiovascular risk factors in patients with Spondyloarthritis from Northern European and Mediterranean countries: an ancillary study of the ASAS-COMOSPA project. *Joint Bone Spine.* 2018; 85(4): p. 447-453.
291. Solomon DH, Love TJ, Canning C, et al. The risk of diabetes among patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and psoriasis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: p. 2114–2117.
292. Papagoras C, Markatseli TE, Saougou I, et al. Cardiovascular risk profile in patients with spondyloarthritis. *Joint Bone Spine.* 2014; 81: p. 57-63.
293. Colaco K OVAAea. Predictive utility of cardiovascular risk prediction algorithms in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *J Rheumatol.* 2020; 47(6): p. 928-938.
294. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, McInnes IB, Haentzschel H, Gonzalez-Gay MA, Provan S, Semb A, Sidiropoulos P, Kitas G, Smulders YM, Soubrier M, Szekanecz Z, Sattar N, Nurmohamed MT. EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(2): p. 325-31.

295. van der Heijde D, Braun J, Deodhar A, et al. Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58: p. 388–400.
296. X Baraliakos, J Listing, M Rudwaleit, H Haibel, J Brandt, J Sieper, J Braun. Progression of radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis: defining the central role of syndesmophytes. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66(7): p. 910-5.
297. Kang KY, Her YH, Ju JH, et al. Radiographic progression is associated with increased cardiovascular risk in patients with axial spondyloarthritis. *Mod Rheumatol*. 2016; 26: p. 601–606.
298. Rueda-Gotor J, Llorca J, Corrales A, et al. Carotid ultrasound in the cardiovascular risk stratification of patients with ankylosing spondylitis: results of a population-based study. *Clin Exp Rheumatol*. 2016; 34: p. 885–892.
299. Rueda-Gotor J, Quevedo-Abeledo JC, Corrales A, et al. Reclassification into very-high cardiovascular risk after carotid ultrasound in patients with axial spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2020; 38: p. 724-731.
300. Rueda-Gotor J, Llorca J, Corrales A, et al. Cardiovascular risk stratification in axial spondyloarthritis: carotid ultrasound is more sensitive than coronary artery calcification score to detect high-cardiovascular risk axial spondyloarthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36: p. 73-80.
301. Eriksson JK, Jacobsson L, Bengtsson K, et al. Is ankylosing spondylitis a risk factor for cardiovascular disease, and how do these risks compare with those in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*. 2017; 76: p. 364–370.
302. Sherine E Gabriel, Cynthia S Crowson. Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012; 24(2): p. 171-6.
303. Daniel H Solomon, Joel Kremer, Jeffrey R Curtis, Marc C Hochberg, George Reed, Peter Tsao, Michael E Farkouh, Soko Setoguchi, Jeffrey D Greenberg. Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(11): p. 1920-5.

304. Lukasz Kozera, Jacqueline Andrews, Ann W Morgan. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis--the next step: differentiating true soluble biomarkers of cardiovascular risk from surrogate measures of inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50(11): p. 1944-54.
305. Joshua L Lee, Premarani Sinnathurai, Rachelle Buchbinder, Catherine Hill, Marissa Lassere, Lyn March. Biologics and cardiovascular events in inflammatory arthritis: a prospective national cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20(1): p. 171.
306. Chun-Hsiung Chen, Hung-An Chen, Chin-Hsiu Liu, Hsien-Tzung Liao, Chung-Tei Chou, Chen-Hung Chen. Association of obesity with inflammation, disease severity and cardiovascular risk factors among patients with ankylosing spondylitis. *Int J Rheum Dis*. 2020; 23(9): p. 1165-1174.
307. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: p. 1388–1398.
308. Kang KY, Kwok SK, Ju JH, et al. The predictors of development of new syndesmophytes in female patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*. 2015; 44: p. 125–128.
309. Ramiro S, van der Heijde D, van Tubergen A, et al. Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: p. 1455–1461.
310. Benoit Le Goff, Béatrice Bouvard, Thierry Lequerre, Eric Lespessailles, Hubert Marotte, Yves-Marie Pers, Bernard Cortet. Implication of IL-17 in Bone Loss and Structural Damage in Inflammatory Rheumatic Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019;: p. 8659302.
311. Neerinckx B LR. Mechanisms, impact and prevention of pathological bone regeneration in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017; 29(4): p. 287-292.
312. R., Botting. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res*. 2003; 110(5-6): p. 269-72.

313. CJ. Hawkey. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001; 15(5): p. 801-20.
314. N S Abraham, H B El-Serag, C Hartman, P Richardson, A Deswal. Cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of myocardial infarction and cerebrovascular accident. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 25(8): p. 913-24.
315. Deepak L Bhatt, James Scheiman, Neena S Abraham, Elliott M Antman, Francis K L Chan, Curt D Furberg, David A Johnson, Kenneth W Mahaffey, Eamonn M Quigley, American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *Circulation*. 2008; 118(18): p. 1894-909.
316. Mukherjee, Debabrata. Does a coxib-associated thrombotic risk limit the clinical use of the compounds as analgesic anti-inflammatory drugs? Arguments in favor. *Thromb Haemost*. 2006; 96(4): p. 407-12.
317. Cipollone, F; Fazio, ML. COX-2 and Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47: p. 26-36.
318. Wen-Chan Tsai, Tsan-Teng Ou, Jeng-Hsien Yen, Cheng-Chin Wu, Yi-Ching Tung. Long-term frequent use of non-steroidal anti-inflammatory drugs might protect patients with ankylosing spondylitis from cardiovascular diseases: a nationwide case-control study. *PLoS One*. 2015; 10(5): p. e0126347.
319. Prati C, Demougeot C, Guillot X, Sondag M, Verhoeven F, Wendling D. Vascular involvement in axial spondyloarthropathies. *JBS*. 2019; 86(2): p. 159-163.

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACPA	Anticuerpos antipéptido citrulinado
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
APs	Artritis psoriásica
AR	Artritis Reumatoide
ASAS	<i>Assessment of Spondyloarthritis Internacional Society</i>
ASAS HI	<i>ASAS Health Index</i>
ASDAS	<i>Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score</i>
AUC	Área bajo la curva
BASDAI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>
BASDAS	BASDAI basado en ASDAS-PCR
BASFI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index</i>
BASMI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index</i>
BEI	<i>Berlin Enthesitis Index</i>
BMP	Proteína morfogenética del hueso
CLASSIC	<i>Classification of Axial Spondyloarthritis Inception Cohort</i>
COX	Ciclooxigenasa
COXIB	Inhibidor de la COX-2
CPAs	Células presentadoras de antígenos
CTX	Enlaces cruzados carboxi- terminal
CV	Cardiovascular
DKK1	Dickkopf-1

DLI	Dolor lumbar inflamatorio
DMO	Densidad mineral ósea
EA	Espondilitis anquilosante
ECV	Enfermedad cardiovascular
EMO	Edema de médula ósea
EspA	Espondiloartritis
EspAax	Espondiloartritis axial
EspAax-nr	Espondiloartritis axial no radiográfica
EspAax-r	Espondiloartritis axial radiográfica
EspAp	Espondiloartritis periférica
ESSG	<i>European Spondyloarthritis Study Group</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EVA	Escala visual analógica
FACIT-Fatigue	<i>Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue</i>
FAME	Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
FAMEsb	FAMEs biológicos
FAMEsc	FAMEs convencionales
FAMEst	FAME sintético dirigido
FR	Factor reumatoide
GIM	Grosor de la íntima media
GLM	MLG Gaussiano
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HDL-C	Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad
HLA	Antígeno leucocitario humano
HTA	Hipertensión arterial

HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
LDL-C	Colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
MASES	<i>Maastricht AS Enthesitis Score</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MLG	Modelo lineal generalizado
MPO	Mieloperoxidasa
mSASSS	<i>Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score</i>
NE	Elastasa de neutrófilos
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOX	NADPH oxidasa
NTX	Enlaces cruzados amino- terminal
NYm	Criterios de Nueva York modificados
PAD4	Peptidilarginina deaminasa 4
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Proteína C Reactiva
PRO	<i>Patient-reported outcome</i>
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RM-SI	Resonancia magnética de articulaciones sacroilíacas

RNP	Ribonucleoproteína
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SCORE	<i>Systemic Coronary Risk Estimation</i>
SEM	Error estándar de la media
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SPARTAN	<i>Spondyloarthritis Research and Treatment Network</i>
Tc	Células T citotóxicas
Th	Células T <i>helper</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCOASMI	<i>University of Córdoba Ankylosing Spondylitis Metrology Index</i>
VSG	Velocidad de sedimentación globular

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL DESARROLLO DE LA TESIS



Enhanced NETosis generation in radiographic axial spondyloarthritis: utility as biomarker for disease activity and anti-TNF- α therapy effectiveness

Patricia Ruiz-Limon^{1,2,3,4*†}, Maria Lourdes Ladehesa-Pineda^{1,2,3†}, Maria del Carmen Castro-Villegas^{1,2,3}, Maria del Carmen Abalos-Aguilera^{1,2,3}, Clementina Lopez-Medina^{1,3}, Chary Lopez-Pedreira^{1,2,3}, Nuria Barbarroja^{1,2,3}, Daniel Espejo-Peralbo^{1,2,3}, Jose Antonio Gonzalez-Reyes⁵, Jose Manuel Villalba⁵, Carlos Perez-Sanchez^{1,2,3}, Alejandro Escudero-Contreras^{1,2,3}, Eduardo Collantes-Estevez^{3,2,1}, Pilar Font-Ugalde^{1,3,2†} and Yolanda Jimenez-Gomez^{1,3,2*†}

Abstract

Background: Radiographic axial spondyloarthritis (r-axSpA) is a chronic inflammatory form of arthritis in which tumor necrosis factor (TNF)- α , a potent inducer of inflammatory response and a key regulator of innate immunity and of Th1 immune responses, plays a central role. NETosis is a mechanism of innate immune defense that is involved in diverse rheumatology diseases. Nevertheless, spontaneous NETosis generation in r-axSpA, its association to disease pathogenesis, and the NETosis involvement on anti-TNF- α therapy's effects has never been explored.

Methods: Thirty r-axSpA patients and 32 healthy donors (HDs) were evaluated. Neutrophil extracellular trap (NET) formation, mediators of signal-transduction cascade required for NETosis induction and cell-free NETosis-derived products were quantified. An additional cohort of 15 r-axSpA patients treated with infliximab (IFX) for six months were further analyzed. In vitro studies were designed to assess the effects of IFX in NETosis generation and the inflammatory profile triggered.

(Continued on next page)

* Correspondence: patrilimon@hotmail.com;
yolanda.jimenezgomez@yahoo.es

[†]Patricia Ruiz-Limon, Maria Lourdes Ladehesa-Pineda, Pilar Font-Ugalde and Yolanda Jimenez-Gomez contributed equally to this work.

¹Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Results: Compared to HDs, neutrophils from r-axSpA patients displayed augmented spontaneous NET formation, elevated expression of NET-associated signaling components, nuclear peptidylarginine deiminase 4 translocation and increased citrullinated histone H3. Furthermore, patients exhibited altered circulating levels of cell-free NETosis-derived products (DNA, nucleosomes and elastase). Additional studies revealed that cell-free NETosis-derived products could be suitable biomarkers for distinguish r-axSpA patients from HDs. Correlation studies showed association between cell-free NETosis-derived products and clinical inflammatory parameters. Besides, nucleosomes displayed potential as a biomarker for discriminate patients according to disease activity. IFX therapy promoted a reduction in both NETosis generation and disease activity in r-axSpA patients. Mechanistic in vitro studies further unveiled the relevance of IFX in reducing NET release and normalizing the augmented inflammatory activities promoted by NETs in mononuclear cells.

Conclusions: This study reveals that NETosis is enhanced in r-axSpA patients and identifies the NETosis-derived products as potential disease activity biomarkers. In addition, the data suggests the potential role of NET generation analysis for assessment of therapeutic effectiveness in r-axSpA.

Keywords: Biomarkers/NETosis/neutrophils/immunotherapy/pathogenesis/radiographic axial spondyloarthritis

Background

Spondyloarthritis (SpA) encompasses a group of chronic inflammatory rheumatic disorders that shares common clinical features, extra-articular manifestations and a strong genetic association with the human leukocyte antigen (HLA)-B27 [1]. The most frequent phenotype is the radiographic axial SpA (r-axSpA), which predominantly affects the axial skeleton and the sacroiliac joints [1]. This clinical form is more common in men than women (ratio 2:1), with a mean age of symptom onset around 26 years [2], and a prevalence ranges between 0.1 and 1.4% globally [3].

The pathological process of r-axSpA is characterized by an early inflammatory stage, followed by a phase of pathological new bone formation with syndesmophytes and ankylosis [4], which lead to a decrease in quality of life in these patients. Although an ever-growing list of factors and mechanisms seem to have a role in the pathogenesis of this disease [5–7], numerous gaps remain in our understanding of the precise molecular processes associated with the triggering, initiation, development, and regulation of this disease.

Immune system cells are essential in the r-axSpA pathogenesis, and although a considerable body of evidence exists regarding the central role of T lymphocytes in the pathological process [8–11], the role of neutrophils has not been examined to the same extent in this disease [12, 13]. Neutrophils are well established players in the immediate response to infections, employing a broad array of strategies including phagocytosis, release of toxic granular enzymes and of reactive oxygen species (ROS), or the generation of NETosis to remove harmful microorganisms [14, 15]. In the NETosis process, neutrophils expulse their nuclear contents to form neutrophil extracellular traps (NETs) that capture and kill microorganisms [16], and are composed of decondensed

chromatin (neutrophil DNA and high affinity histones), which is covered with antimicrobial peptides and oxidant-generating enzymes [i.e. neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), NADPH oxidase, and nitric oxide synthase] [17–19]. The underlying signal-transducing pathway leading to NETs formation involves calcium mobilization, proinflammatory mediators, generation of ROS, nuclear delobulation by NE and MPO, and citrullination of histones by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4), all of them essential to chromatin decondensation and DNA extrusion [18, 20–24].

Whereas the initial observation of NET formation showed to this process as an essential strategy to immobilize and kill invading microorganisms, extensive evidence suggest that aberrant NET formation is also central in a number of pathologies including rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) [25–27]. However, to date no study has evaluated the NET generation and the regulation of their release in SpA patients.

Therefore, the present study was designed to determine the NETotic response of neutrophils in r-axSpA, with particular concern to the underlying signal-transduction cascade, and whether the NETosis-derived products could be associated to r-axSpA, and could be useful for the prognostic and monitoring of the disease. In addition, as tumor necrosis factor (TNF)- α plays a central role in the pathogenesis of r-axSpA patients [28] and is a NETosis-inducing agent [24], the involvement of NETosis on the effects of infliximab (IFX), an anti-TNF- α drug, was further evaluated.

Methods

Study design and participants

In total, 30 r-axSpA patients and 32 healthy donors (HDs) matched for age and sex were included in the

cross-sectional study. One more cohort of 15 r-axSpA patients treated with IFX (3 mg/kg/day intravenous infusion at times 0, 2 and 6 weeks, and every 8 weeks thereafter) for six months was also studied. All the r-axSpA patients fulfilled ASAS classification criteria for the classification of axSpA [29]. Exclusion criteria were: pregnancy, malignancies, chronic infections, other rheumatology diseases, extra-articular manifestations [psoriasis, inflammatory bowel disease (IBD), uveitis] and patients unable to understand the procedures to the protocol.

The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All experimental protocols were approved by the ethics committee of the Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain, and written informed consent was obtained.

In the cross-sectional study, a case report form was used to collect the following clinical data: age, gender, disease duration, HLA-B27 status, plasma TNF- α and interleukin (IL)-1 β concentration (pg/mL), and current medications. Disease activity was determined by C-reactive protein (CRP; nmol/L), erythrocyte sedimentation rate (ESR; mm/h) and the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) [30]. Spinal functionality and mobility of patients were evaluated by the Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index (BASFI) [31] and the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) [32], respectively. Structural damage was assessed by the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS) [33].

In the longitudinal study, the case report form included the following clinical data:

- a) Baseline: age, gender, disease duration, HLA-B27 status, and current medications. Disease activity was determined by CRP (mg/L), ESR (mm/h), and the BASDAI [30]. Functionality of r-axSpA patients were evaluated by the BASFI [31]. Structural damage was assessed by the mSASSS [33].
- b) After six months of IFX treatment: Disease activity was determined by CRP (nmol/L), ESR (mm/h), and the BASDAI [30]. Functionality of r-axSpA patients were evaluated by the BASFI [31].

Blood sample collection and assessment of biological parameters

Peripheral venous blood samples were collected after a fasting period (8 h) in sterile tubes containing 0.129 M sodium citrate (Becton Dickinson, Meylan, France) and Z Serum Sep Clot Activator (Vacuette, Madrid, Spain), and were processed within 4 h of collection. Plasma and serum were aliquoted and stored at -80°C until their analysis. Laboratory markers of inflammation (ESR, CRP) and genetic factors (HLA-B27) were quantified as part of routine patient management.

Inflammatory markers in plasma

Plasma levels of TNF- α and IL-1 β were examined using a Bio-Plex Pro Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to manufacturer's instructions.

White blood cells isolation

Neutrophils were isolated from patients and HDs' blood by density centrifugation over Dextran-Ficoll as described by Nauseef et al [34]. As neutrophils could be activated by the isolation method, CD11b and CD62L expression were evaluated in healthy neutrophils ($n = 5$) from buffy coat (800 x g for 15 min at room temperature (RT) with the brake off centrifugation) and after dextran sedimentation followed Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Both neutrophil activation markers were measured by flow cytometry (single-laser FACScalibur cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using anti-human CD11b PE (BD Biosciences) and anti-human CD62L FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA). Non-statistically significant difference in CD11b and CD62L expression was found between buffy coat and the isolation method (Fig. S1).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HDs' whole blood were separated by Ficoll gradient centrifugation (StemCell Technology, Oslo, Norway).

Purity of the populations was assessed by flow cytometry (single-laser FACScalibur cytometer, BD Biosciences) by analyzing the size and complexity (forward and size scatters). The purity was routinely $\geq 95\%$ for both neutrophils and PBMCs.

NETs generation and quantification

Neutrophils isolated from r-axSpA patients ($n = 6$) and HDs ($n = 6$) were seeded into 24-well plates (6×10^5 cells per well) on poly-L lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences) at 37°C under $5\% \text{CO}_2$. Then, cells were incubated in vitro for 6 h to determine spontaneous NETosis or treated with 600 nM of the potent NETosis inducer PMA (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) for 2 h. Next, neutrophils were fixed with 4% paraformaldehyde (15 min) and rinsed three times with PBS. Firstly, a Sytox orange dye staining (Life Technologies, Bleiswijk, Netherlands) (5 mM) was used to visualize DNA using a Nikon Eclipse-Ti-S fluorescence microscope (Nikon, Amsterdam, Netherlands). To evaluate NETosis generation, a total of five images selected randomly from different regions of each coverslip per case were taken with a 20x objective in each sample. NETs were manually identified on digitalized images as Sytox-positive structures emanating from cells with overall length greater than 2x cell area from cells untreated [35] and were counted for at least 3 times by two independent observers using IMAGE-J software (NIH, Bethesda, MD,

USA). Results were expressed as percentage of NETs (NETs formation).

Secondly, neutrophils were stained with NE antibody and DAPI (as nuclear staining). Briefly, fixed cells were exposed to anti-human NE antibody (1:40) [RbmAb to Neutrophil Elastase (Abcam, Cambridge, UK)] overnight at 4 °C, and then incubated with Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:1000) (Abcam) for 1 h at 4 °C. Nuclear DNA was detected by incubating marked cells with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (300 nM) for 3 min at RT. Samples were visualized using a Nikon Eclipse-Ti-S fluorescence microscope (Nikon). The recorded images were loaded onto IMAGE-J software (NIH) for analysis and quantified by two independent observers. The colocalization between NE and DAPI was estimated by determining an overlapping pixel map of the two fluorescent channels. Netting neutrophils were considered those positive for both NE and DAPI. NETs were calculated as the average of cells stained with NE and DAPI [(at least 5 fields of each coverslip per case ($\times 20$))] normalized to the total number of cells. Results were expressed as percentage of NE/total cell number.

For scanning electron microscopy, neutrophils from r-axSpA patients ($n = 3$) and HDs ($n = 3$) were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 45 min, washed twice in the same buffer for 10 min each and dehydrated in a series of ethanol. Absolute ethanol was changed 3 times (10 min each). Afterwards, ethanol was removed and the samples were kept at 35 °C for 20 min and gold shadowed using a High Vacuum Coater Leica EM ACE600 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Samples were viewed and photographed using a JEOL JSM-7800F Field Emission Scanning Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Quantification of supernatant cell-free DNA

Neutrophils isolated from r-axSpA patients ($n = 6$) and HDs ($n = 6$) were seeded with RPMI 1640 without phenol red (Sigma-Aldrich) into 96-well black microplate (2×10^4 cells per well) and stained with 0.2 μ M Sytox green dye (Sytox Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen) for 6 h at 37 °C in the dark. As a positive control, neutrophils were incubated in the presence of 600 nM PMA (Sigma-Aldrich) for 2 h. Then, absorbance was read in an Infinite F200[®] Pro plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) with a filter setting of 485 (excitation)/528 (emission). The results were expressed as relative fluorescence units (RFU) minus background control.

Gene expression

Total RNA from neutrophils and PBMCs was extracted using TRIsure (Bioline, Taunton, MA, USA) following the manufacturer's recommendations. A prerequisite for

samples to be included in the RT-qPCR was a non-degraded pattern of the 18S and 28S subunits of ribosomal RNA in a 1.2% agarose gel. The RNA purity was verified by optical density (OD) absorption ratio OD260/OD280 that was between 1.8 and 2.0. Next, RT-qPCR was conducted in two steps. RT was performed using QuantiTect[®] Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The expression levels of inflammatory mediators were then measured by real-time PCR using a LightCycler[®] Thermal Cycler System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The reaction was carried out with SYBR[®] Green PCR master mix (Takara Bio Inc., Madrid, Spain) according to manufacturer's protocol. The primer sequences are listed in Table 1. GAPDH was selected as housekeeping gene. Real-time PCR data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The expression of target genes was normalized to the mean of the housekeeping gene. All measurements were performed in duplicate. Controls consisting of reaction mixture without cDNA were negative in all runs. Fidelity of the PCR was determined by melting temperature analysis.

Determination of oxidative stress markers in neutrophils

Oxidative stress biomarkers were analysed in a single-laser FACSCalibur (BD Biosciences) cytometer. Test standardization and data acquisition analysis were performed using the CELL Quest software (BD Biosciences). A forward and side scatter gate was used for the selection and analysis of the different cell subpopulations.

For the assessment of ROS generation, including peroxides and peroxinitrites, cells were incubated with 20.5 μ M Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFHDA; Sigma-Aldrich) and 5 μ M DihydroRhodamine-123 (DHRH123; Sigma-Aldrich) for 30 min in the dark at 37 °C. For the detection of intracellular glutathione (GSH), cells were incubated with 1 μ M 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMF-DA) (Invitrogen) for 30 min in the dark at 37 °C. The cells were washed, re-suspended in PBS, and then analysed on a single-laser FACSCalibur (BD Biosciences) cytometer. The JC1 Mitoscreen assay (BD Biosciences) was used (final concentration 2 μ M) to assess mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) according to manufacturer's instructions.

Myeloperoxidase (MPO) and NE protein expression

Whole peripheral blood (100 μ l) was incubated with 1 ml of lysis buffer (BD Pharm Lyse Lysing Buffer, BD Biosciences) for 10 min at RT in the dark. After centrifugation at 300 g for 5 min at 4 °C, cells were fixed and permeabilized with 250 μ l of buffer (BD Cytotfix/Cytoperm[™] Fixation/Permeabilization solution Kit with BD Golgi Plug[™], BD Biosciences) for 20 min at 4 °C, and then exposed to either FITC anti-human MPO antibody (BD

Table 1 Primer list

Primer	Supplier	Sequence 5'-3'	
		Forward	Reverse
GADPH	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	ACATCGCTCAGACACCATG
STAT-3	IDT, Leuven, Belgium	AGGCATTGGCATCTGACAG	TGCTCCCTGATTGTGACTG
TNF-α	IDT	TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC	TGCACCTTTGGAGTGATCGG
IL-1β	Qiagen, Hilden, Germany	Not provided by the manufacturer	Not provided by the manufacturer
IL-1α	IDT	AGTTCTTAGTGCCGTGAGTTTC	GTGACTGCCCAAGATGAAGA
IL-6	IDT	GCCCCACACAGACGCCACTCACC	TGCCTCTTTGCTGCTTTACACAT
IL-23	IDT	GGCGCAGAGCCAGCCAGATT	ACCCTCAGGCTGCAGGAGTTGG

GADPH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNF, tumor necrosis factor

Biosciences) or anti-human NE antibody (1/20) [(RbmAb to Neutrophil Elastase (Abcam)]. After incubation of cells with the primary antibodies for 20 min at 4 °C, an Alexa Fluor-488 conjugated secondary antibody (1:1000) (Abcam) was added for 30 min at 4 °C to analysis NE levels. IgG isotypes were used as negative controls. Cells were washed and acquired on the flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences).

Protein extraction and western blotting

Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared according to standard protocols [36] and the Bradford assay method (Bio-Rad) was used to determine protein concentration. Then, 20 μ g of both cytoplasmic and nuclear extracts were separated by SDS-PAGE. Antibodies against PAD4 (1:1000; Abcam), citrullinated histone H3 (CitH3) (1:1000; Abcam) and nuclear factor (NF)- κ B (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) were dispensed overnight (4 °C) and peroxidase-conjugated secondary antibody was administered for 1 h (RT). The immunoreaction was visualized using ECL plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Stain-free technology (Bio-Rad) was used as loading protein control and densitometric analysis was performed with Image Lab software (Bio-Rad).

Detection of circulating levels of cell-free DNA, nucleosomes and elastase

To quantify circulating cell-free DNA, 10 μ L of plasma from r-axSpA patients and HDs was placed into 96-well black microplate and stained with 1 μ M Sytox green dye (Sytox Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen) in Tris-buffered saline [TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.5 and 150 mM NaCl)] at RT for 15 min in the dark. Next, plates were read in Infinite F200[®] Pro plate reader (Tecan Group Ltd) with a filter setting of 485 (excitation)/528 (emission). The data were analysed using a serial dilution of DNA from salmon as calibration curve.

Nucleosomes were measured by using the Human Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Briefly, monoclonal

antibodies against DNA (double and single strand) and histones (H1, H2A, H2B, H3 and H4) were used to detect mono- and oligo-nucleosomes in serum from r-axSpA patients and HDs. Quantification of nucleosomes was carried out by photometric determination of the absorbance at 405 nm (reference wavelength: 492 nm). Neutrophil elastase was measured by PMN Elastase Human ELISA kit (Abcam) in serum from r-axSpA patients and HDs following the manufacturer's recommendations.

In vitro studies

To assess the effects of IFX on NETosis generation, HD neutrophils ($n = 3$) were isolated and pretreated for 15 min at 4 °C with FCRII blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Then, neutrophils were washed with PBS, centrifuged at 300 g for 10 min, seeded in 24 well plates on poly-L lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences) (6×10^5 cells per well) in RPMI 1640 supplemented with 20% BSA (PanReacAppliChem, Barcelona, Spain), 2 mM L-glutamine (Biowest, Nuaillé, France) and 1% ZellShield (Minerva Biolabs, BMBH, Berlin, Germany) at 37 °C and 5% CO₂. Next, neutrophils were treated with TNF- α (8 ng/mL; Prepro-Tech, Rocky Hill, NJ, USA), a potent NETosis inducer, in the presence or in the absence of IFX (100 mg/ml; Pfizer, NY, USA) for 2 h. NETotic response was evaluated as previously described.

To evaluate the effects of IFX on the proinflammatory profile of mononuclear cells promoted by NETs, PBMCs from previous HDs ($n = 3$) were seeded in 24-well ultra-low attachment plate (Sigma Aldrich) (1×10^6 cells per well) and treated for 24 h with supernatants obtained from above-described in vitro experiments which were pre-incubated in the presence or absence of 15 U/ml DNase I (NZYTech-Genes & Enzymes, Lisbon, Portugal) for 10 min. PBMCs were harvested for protein and RNA determination.

Statistical analysis

Statistical analysis used SPSS statistical software, version 19.0 for WINDOWS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A

statistical power calculation in our cross-sectional study indicated that accepting an alpha risk of 0.05 in a two-sided test with 30 subjects in the r-axSpA group and 32 in the HD group, the statistical power in the nucleosome levels was 100% to recognize as statistically significant the difference of means (1.12 in the r-axSpA group and 0.24 in the HD group). For our longitudinal study, the statistical power calculation pointed out than accepting an alpha risk of 0.05 in a two-sided test with 15 r-axSpA patients, the statistical power in the nucleosome concentration was 92% to recognize as statistically significant the difference of means (2.39 in the r-axSpA group before treatment and 1.04 at 6 months of IFX therapy). Although we used the nucleosomes to set statistical power, because this cell-free NETosis-derived product was a potential biomarker for the prediction of activity in r-axSpA patients, we were equally interested in changes in the other variables of our study. The statistical power in the remaining parameters was at least 80%. The normal distribution of variables (Gaussian data) to characterize differences in the analyzed parameters was assessed using the Kolmogorov-Smirnow test. For continuous data, comparison among variables were performed using Independent Student's tests or Paired Student's tests for Gaussian data and using Mann-Whitney rank sum tests, Wilcoxon tests or Kruskal-Wallis H tests for non-normally distributed data. Categorical data were analyzed using the χ^2 Test or Fisher's Exact Probability Test, as appropriate. Multiple linear regression analysis was performed to exclude the influences of potential confounding variables. Correlations were assessed by Spearman's rank correlation.

Receiver operating characteristics (ROC) curves and the area under the curve (AUC) analysis were used to determine the sensitivity, specificity and corresponding cut-off values for each circulating cell-free NETosis-derived products in order to distinguish r-axSpA patients from HDs, and for discrimination of active vs. non-active r-axSpA patients. Active patients were considered those with a CRP level > 47.62 nmol/L, and/or patients with a BASDAI score ≥ 4 and ESR > 20 mm/h [37]. Logistic regression was used to develop composite panels of biomarkers to identify signatures that could distinguish r-axSpA from HDs with the greatest sensitivity and specificity. ROC analysis for composite panels was calculated. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Study population

Clinical and laboratory parameters of the r-axSpA patients and the healthy age- and sex-matched donors included in the cross-sectional study are described in Table 2. Patients had an average age of 46.4 ± 13.4 years, with a disease duration of 13.2 ± 11.3 years and a mean

Table 2 Clinical and Laboratory Parameters of the Radiographic Axial Spondyloarthritis Patients and the Healthy Donors

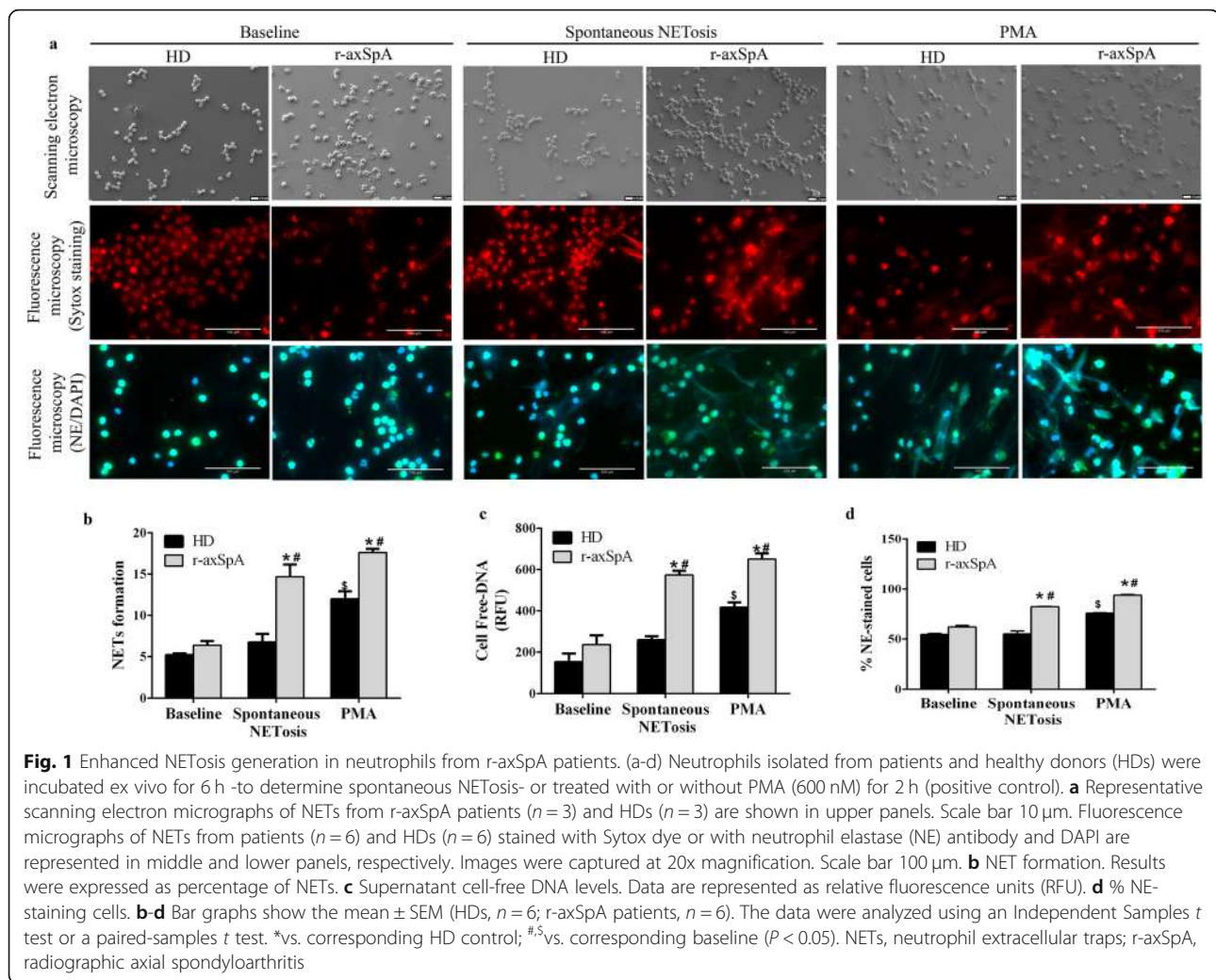
	r-axSpA patients (n = 30)	Healthy Donors (n = 32)	P
Clinical parameters			
Women/men, n/n	5/25	10/22	0.180
Age, y	46.40 ± 2.45	41.06 ± 1.77	0.080
BASDAI	4.42 ± 0.45	...	
BASFI	4.73 ± 0.61	...	
BASMI	3.22 ± 0.31	...	
mSASSS	19.16 ± 3.86	...	
Disease duration, y	13.23 ± 2.07	...	
Extra-articular manifestations			
> Uveitis	0/30	0/32	
> Psoriasis	0/30	0/32	
> IBD	0/30	0/32	
Laboratory parameters			
HLA-B27 (%)	26/30 (86.67%)	...	
CRP [†] , nmol/L	122.57 ± 31.38	13.62 ± 3.25	< 0.001
ESR [†] , mm/h	19.84 ± 4.09	7.48 ± 1.00	0.006
TNF- α , pg/mL	10.89 ± 1.82	4.02 ± 1.20	0.021
IL-1 β , pg/mL	2.46 ± 0.22	1.57 ± 0.27	0.047
Treatments			
NSAIDs (%)	28/30 (93.33%)	...	
Sulfasalazine (%)	2/30 (6.67%)	...	

Values are presented as mean \pm SEM. The data were analyzed using an Independent Samples t test or a Mann-Whitney U test to evaluate statistical significance between r-axSpA patients and healthy donors. [†]Non-normally distributed data. BASDAI indicates Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index; BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HLA, human leukocyte antigen; IBD, inflammatory bowel disease; IL, interleukin; mSASSS, modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; r-axSpA, radiographic axial spondyloarthritis; TNF, tumor necrosis factor

score of total BASDAI and mSASSS of 4.4 ± 2.5 and 19.2 ± 21.1 , respectively. Overall, patients exhibited greater mean levels of inflammatory markers (ESR, CRP, TNF- α , IL-1 β) than HDs ($P < 0.05$), and a total of 86.7% of patients presented HLA-B27 antigen. There were no patients affected by anterior uveitis, IBD or psoriasis, although four of them had presented anterior uveitis in the past. Regarding treatment, 93.3% were taking non-steroidal anti-inflammatory drugs and 6.7% sulfasalazine.

Enhanced NETs generation in r-axSpA patients

Compared to HDs, r-axSpA-derived neutrophils displayed augmented spontaneous NETs extrusion, as demonstrated by fluorescence microscopy, fluorimetry, and scanning electron microscopy (Fig. 1a-d). Indeed,



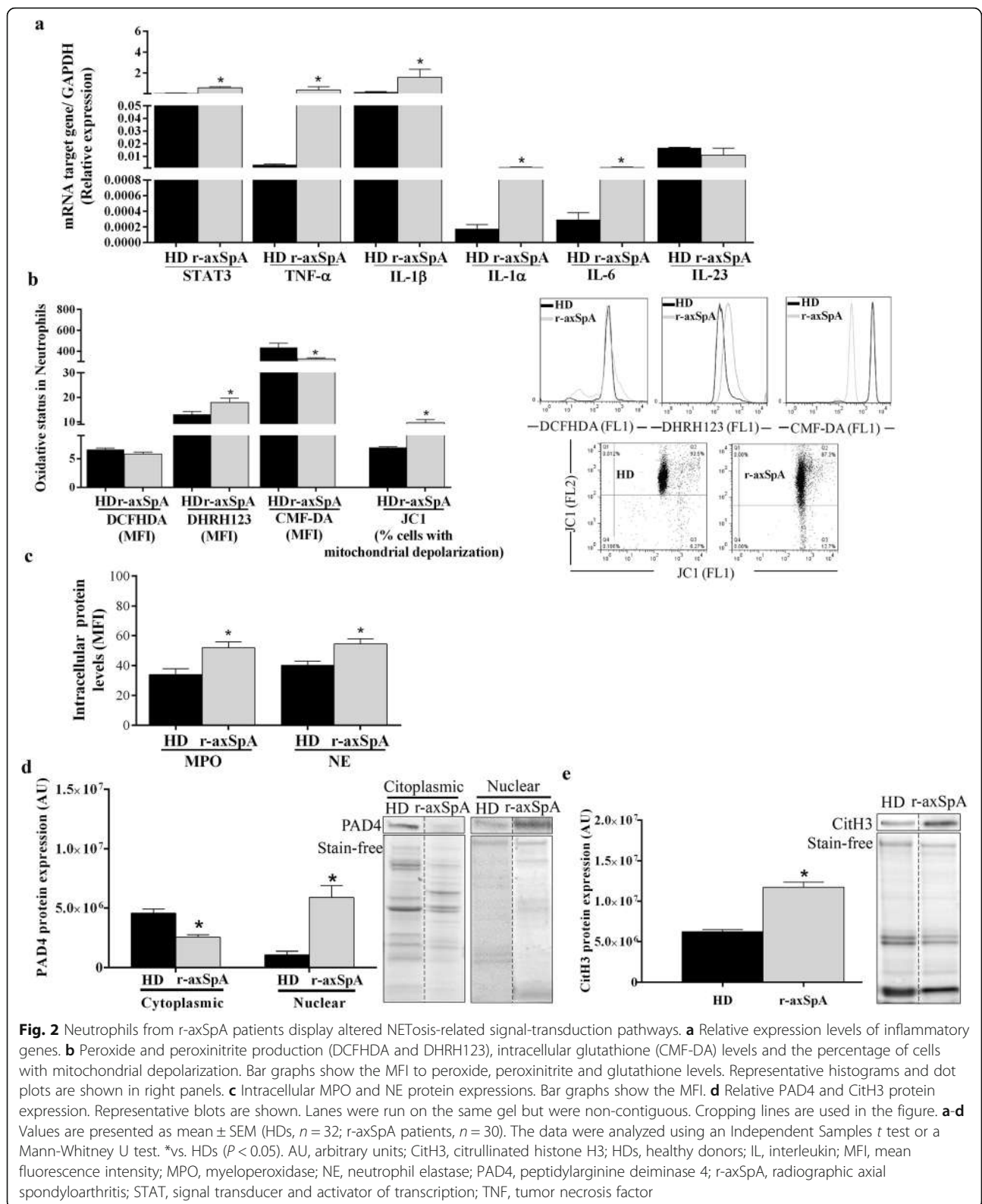
analysis of DNA fibers staining by SYTOX and cell-free DNA levels revealed that neutrophils from patients generated NETs to a greater magnitude than those from HDs after 6 h of ex vivo incubation ($P < 0.05$; Fig. 1a-c). Accordingly, statistically significant differences in DNA fibers and cell-free DNA levels were detected between both groups at 6 h ($P < 0.05$; Fig. a-c). Increased spontaneous NETs production in this pathology was additionally corroborated by the observation of an enhanced percentage of NE-staining cells at 6 h, as assessed by fluorescence microscopy ($P < 0.05$; Fig. 1a and d). PMA, known to promote NETosis, was used as positive control (Fig. 1a-d).

Augmented expression of NET-associated signaling components, nuclear PAD4 translocation, and increased histone H3 citrullination in neutrophils from r-axSpA patients

We next studied signaling elements and molecular mechanisms involved in the NETosis process [21, 23, 24, 38]. In

our hands, r-axSpA-derived neutrophils displayed augmented expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), TNF- α , IL-1 β , IL-1 α and IL-6, as well as higher peroxynitrites production, reduced total GSH levels and increased percentage of cells with altered $\Delta\Psi\text{m}$ as compared to those from HDs ($P < 0.05$; Fig. 2a and b). Additionally, higher intracellular NE and MPO levels were found in r-axSpA-derived neutrophils as compared to HDs ($P < 0.05$; Fig. 2c).

Citrullination of histone subunits, such as H3, by PAD4 promotes chromatin decondensation [39]. Because PAD4 translocation to nucleus is necessary to exert its function, we next explored PAD4 localization (i.e. nucleus and cytoplasm) and observed that this enzyme was preferentially located in the nucleus of neutrophils from patients as compared to those from HDs ($P < 0.05$; Fig. 2d). The nuclear presence of PAD4 was associated with augmented CitH3 levels in neutrophils from r-axSpA patients vs. HDs ($P = 0.016$; Fig. 2e).



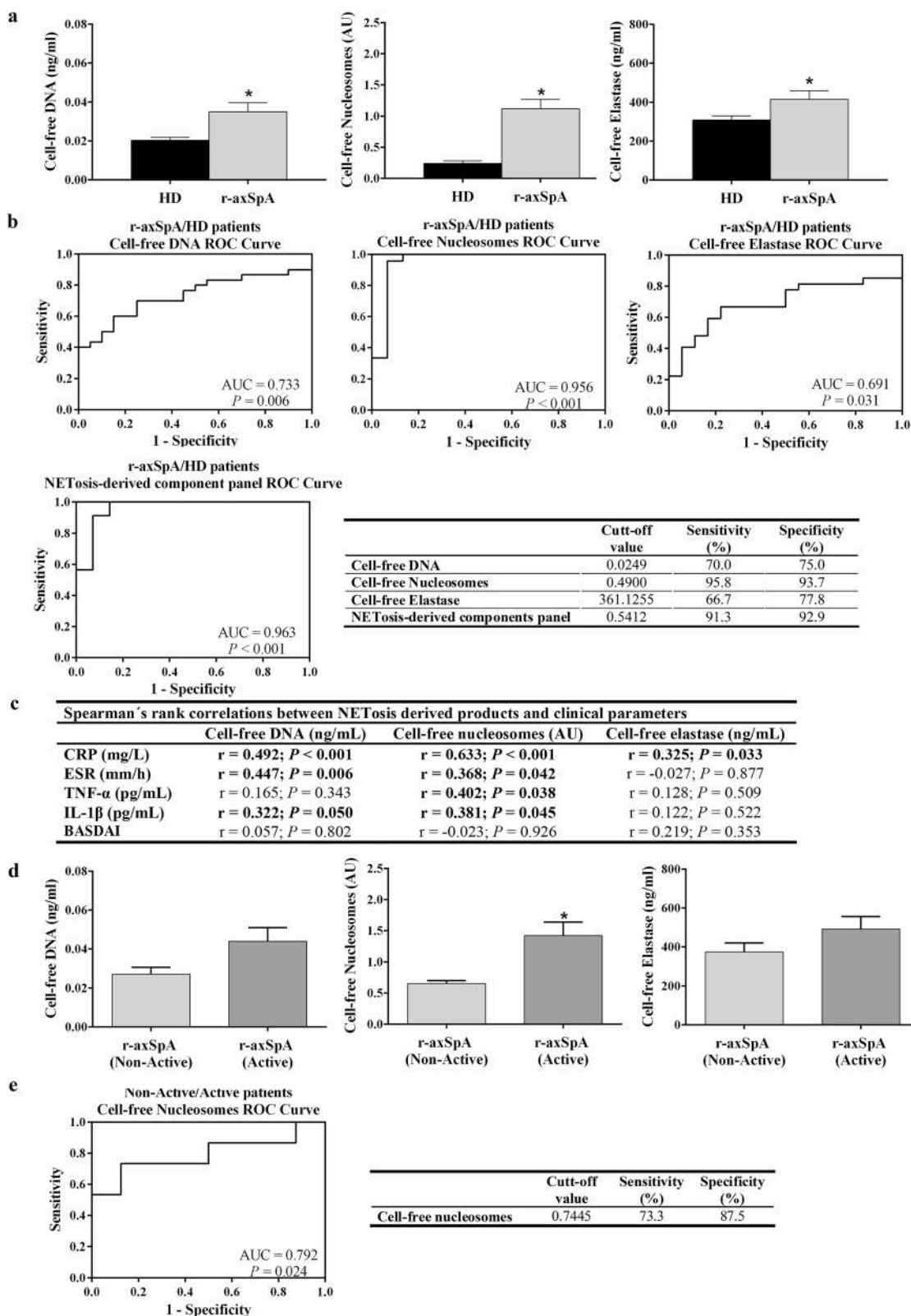


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 3 NETosis-derived products are augmented in r-axSpA patients and are biomarkers associated to r-axSpA and disease activity. **a** Circulating levels of NETosis-derived products. Values are represented as mean \pm SEM (HDs, $n = 32$; r-axSpA patients, $n = 30$). The data were analyzed using an Independent Samples *t* test. *vs. HDs ($P < 0.05$). **b** ROC curve analyses of the NETosis-derived products and a combination of these as a panel were performed to assess their potential as biomarkers associated to r-axSpA. A cut-off value with higher specificity and sensitivity was tested. **c** Spearman's rank correlations between NETosis-derived products and clinical inflammatory parameters. **d** Circulating cell-free NETosis-derived products in active ($n = 18$) and non-active r-axSpA patients ($n = 12$). Data are shown as mean \pm SEM. The data were analyzed using an Independent Samples *t* test. *vs. HDs ($P < 0.05$). **e** A ROC curve analysis of the circulating cell-free nucleosomes was performed to assess its potential as biomarker for disease activity in r-axSpA. A cut-off value with higher specificity and sensitivity was tested. AU, arbitrary units; AUC, Area Under the Curve; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HDs, healthy donors; IL, interleukin; r-axSpA, radiographic axial spondyloarthritis; ROC, receiver operating characteristics; TNF, tumor necrosis factor

The r-axSpA patients display altered levels of NETosis-derived products in circulation

Cell-free DNA levels were significantly higher in plasma samples from r-axSpA patients as compared to HDs ($P = 0.007$; Fig. 3a). In parallel, the concentrations of cell-free nucleosomes and elastase were also found elevated in r-axSpA serum related to HD serum ($P < 0.05$; Fig. 3a). Next, multiple linear regression analysis was used to determine the association of these NETosis-derived products with age, gender and diagnosis (r-axSpA vs. HDs). No gender and age rather than diagnosis was statistically proven to act as a variable associated with cell-free DNA, nucleosome and elastase concentrations (Table S1). Next, r-axSpA patients were grouped in three blocks of disease duration (≤ 10 years, 11–20 years, > 20 years) in order to evaluate the association of this factor with the levels of these circulating cell-free NETosis markers. Comparisons among groups demonstrated non-significant difference in the concentration of these products (Table S2).

To study the relevance of the aforementioned NETosis-derived products as potential biomarkers of disease for r-axSpA patients, ROC curves analysis was carried out. As shown in Fig. 3b, circulating levels of cell-free DNA, nucleosomes and elastase could accurately distinguish r-axSpA patients from HDs, with the AUC ranging from 0.691 to 0.956. To further explore the accuracy of these circulating components for discriminating r-axSpA patients from HDs, a combination of the three-products as a panel was performed by using logistic regression on the data set. After multivariate analysis, no gender and age rather than diagnosis (r-axSpA vs. HDs) was statistically proven to act as a variable associated with the levels of the three-product signature (Table S1). Furthermore, comparative analysis between disease duration-stratified groups also showed non-significant difference in the levels of the NETosis-derived component panel (Table S2). The combination of these NETosis markers as a panel showed an evident accuracy, with an AUC of 0.963 ($P < 0.001$) at a sensitivity of 91.3% and a specificity of 92.9% from a cut-off value of 0.541 (Fig. 3b). Hence, NETosis-derived

products may be suitable biomarkers for discrimination between r-axSpA patients and HDs.

Circulating cell-free NETosis-derived products are associated to clinical inflammatory parameters

We next studied the correlation between circulating NETosis-derived products and clinical inflammatory parameters (Fig. 3c). Circulating cell-free DNA and nucleosome levels positively correlated with CRP, ESR and IL-1 β concentrations. Besides, cell-free nucleosome levels were also positively associated with TNF- α concentration, and cell-free elastase levels with CRP concentration. Non-statistically significant correlation was observed between BASDAI and the NETosis-derived products.

Utility of circulating cell-free nucleosomes as biomarkers for disease activity in r-axSpA patients

To further explore the potential usefulness of circulating NETosis-derived products as disease activity biomarkers, we analyzed the association of these NET components with the clinical activity of the r-axSpA patients. The patients were divided into two subgroups based on CRP and ESR levels, and the BASDAI score. Patients with a CRP level > 47.62 nmol/L and/or patients with a BASDAI score ≥ 4 and ESR > 20 mm/h were considered as active patients ($n = 18$), while the others were classified as non-active patients ($n = 12$) [37]. We found that cell-free nucleosome levels were significantly increased in active vs. non-active r-axSpA patients ($P = 0.007$; Fig. 3d). Non-statistically significant difference was detected in the rest of analyzed parameters.

To study whether cell-free nucleosomes can be used as potential biomarkers for disease activity in r-axSpA patients, ROC curve analyses were performed. This analysis revealed that nucleosomes displayed an evident accuracy, with a power AUC of 0.792 ($P = 0.024$; sensitivity = 73.3%, specificity = 87.5%, cut-off value = 0.744) (Fig. 3e). Consequently, our results suggest that circulating cell-free nucleosomes exhibits great potential as a biomarker for discrimination of active vs. non-active r-axSpA patients.

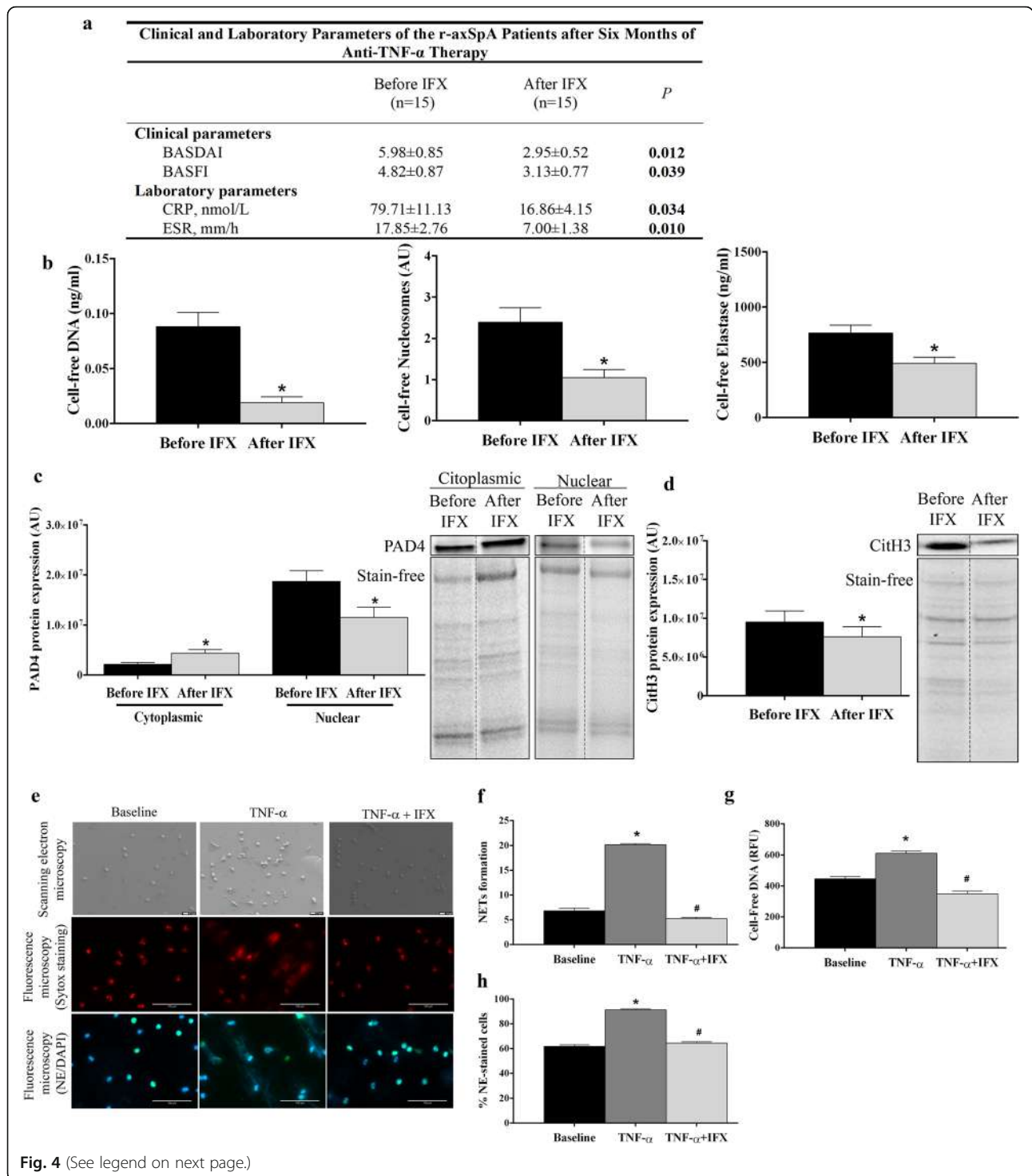


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Anti-TNF- α therapy decreases NETosis. **a** Clinical and laboratory parameters, and **(b)** circulating levels of cell-free NETosis-derived products at baseline and after 6 months of infliximab (IFX) therapy. **c-d** Relative PAD4 and CitH3 protein expression at baseline and after IFX therapy. Representative blots are shown. Lanes were run on the same gel but non-contiguous. Cropping lines are used in the figure. **e-h** To assess the effect of IFX on NET formation, HD neutrophils ($n = 3$) were treated with TNF- α (8 ng/mL) in the presence or absence of IFX (100 mg/ml) for 2 h. **e** Representative scanning electron micrographs of NETs are shown in upper panels. Scale bar 10 μm . Fluorescence micrographs of NETs stained with Sytox dye or with neutrophil elastase (NE) antibody and DAPI are represented in middle and lower panels, respectively. Images were captured at 20x magnification. Scale bar 100 μm . **f** NET formation. Results were expressed as percentage of NETs. **g** Supernatant cell-free DNA levels. Data are represented as relative fluorescence units (RFU). **h** % NE-staining cells. **a-h** Bar graphs show the mean \pm SEM. The data were analyzed using a paired-samples *t* test. *vs. baseline, #vs. TNF- α ($P < 0.05$). AU, arbitrary units; BASDAI indicates Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index; CitH3, citrullinated histone H3; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HD, healthy donor; NETs, neutrophil extracellular traps; PAD4, peptidylarginine deiminase 4; r-axSpA, radiographic axial spondyloarthritis; TNF, tumor necrosis factor

Anti-TNF- α therapy reduces NETosis generation in r-axSpA patients

To explore the effect of anti-TNF- α therapy on expression levels of circulating components of NETs, a new cohort of 15 r-axSpA patients were included in a six-month longitudinal study (Table S3). After IFX therapy, the CRP and ESR levels, and the BASDAI and BASFI score improved significantly ($P < 0.05$; Fig. 4a). In parallel, r-axSpA patients exhibited a reduction in circulating levels of cell-free DNA, nucleosomes and elastase after six months of IFX treatment ($P < 0.05$; Fig. 4b). Accordingly, neutrophils displayed lower PAD4 expression levels in the nucleus compartment, along with a diminution of citH3 concentration after treatment ($P < 0.05$; Fig. 4c and d).

In vitro study showed that NETosis promoted by TNF- α was prevented by IFX, as demonstrated by a reduction in DNA fibers extrusion, cell-free DNA levels, and the percentage of NE-staining neutrophils ($P < 0.05$; Fig. 4e-h).

Inhibition of NETs release by in vitro IFX treatment modulates the inflammatory profile in peripheral blood mononuclear cells

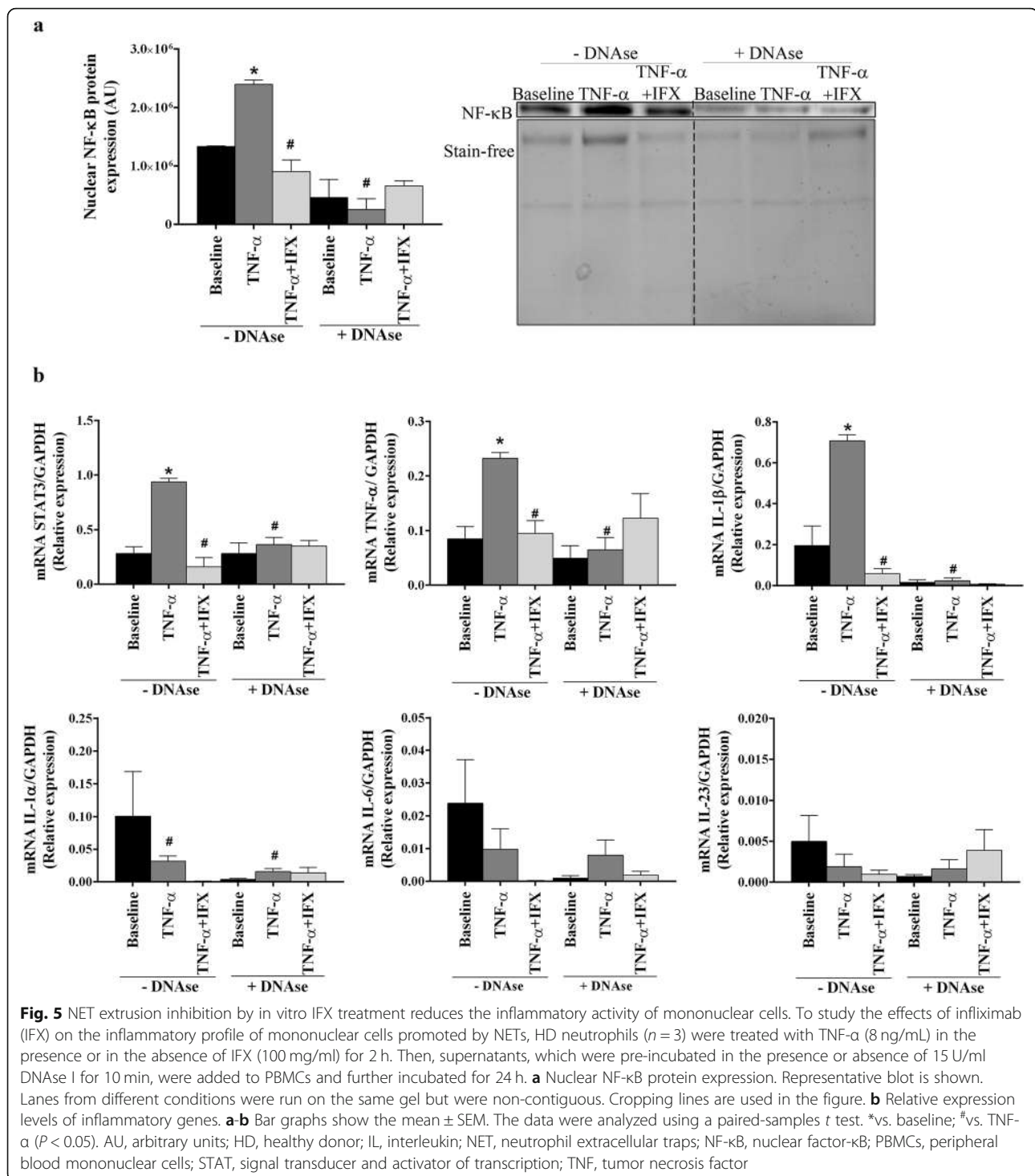
The prevention of NETosis generation by combined treatment of neutrophils with TNF- α plus IFX further promoted the normalization of inflammatory activities in PBMCs. Thus, while HD-derived neutrophils treated with TNF- α induced a translocation of NF- κB into the nucleus ($P = 0.05$; Fig. 5a) and the over-expression of proinflammatory mediators ($P < 0.05$; Fig. 5b) in PBMCs as compared to baseline, combined treatment with IFX significantly reduced those effects ($P < 0.05$; Fig. 5). The DNase treatment abolished the TNF-induced increase of proinflammatory activities of mononuclear cells, indicating the NET process as the main inductor of circulating PBMCs. Hence, these data emphasize the role of NETosis on the establishment of an inflammatory status in r-axSpA patients, and the inhibitory effects of both of them by biological drugs.

Discussion

To our knowledge, data from the current study were the first to show that r-axSpA-derived neutrophils are prone to generate spontaneous NETosis, underlying a new potential mechanism in the disease pathogenesis. In addition, we found that circulating cell-free NETosis-derived products, as biomarkers, could distinguish r-axSpA patients from HDs, and could discriminate patients according to disease activity. Besides, our study revealed a direct effect of anti-TNF- α therapy in inhibiting NETosis process, thus preventing the toxic side effects promoted by this phenomenon into inflammation.

The r-axSpA is a form of chronic multisystem inflammatory disorder [4], in which activated neutrophils play a crucial role in the progression of disease symptoms [13, 40]. Notwithstanding, to date, the potential involvement of NETotic events in the pathophysiology of this rheumatic disease has not been evaluated.

NETosis is a phenomenon involved in the innate immune response against infections by which neutrophils trap and/or kill pathogens. However, NET formation may function as a double-edged sword, contributing not only to pathogen control, but also as putative source of molecules with proinflammatory roles that may contribute to damage within inflamed tissues. Consequently, NETosis could be involved in the development and evolution of rheumatic diseases. In this regard, NET formation has been associated to the pathology of several autoimmune diseases, including RA and SLE [25–27]. The present study extends these observations and shows that NETosis is also enhanced in r-axSpA, further associated to changes in the underlying signal-transduction cascade required for the induction of this phenomenon. Among them, ROS generation is an essential process that induces NET formation. A previous study by Ugan et al., [12] demonstrated that r-axSpA-derived neutrophils displayed an oxidative status as compared to those from healthy controls. This observation was corroborated by our present findings, where an oxidative burden,



evidenced by a disequilibrium between oxidant and antioxidant systems, and a significant loss in $\Delta\Psi$ m, was detected in r-axSpA-derived neutrophils. In addition, we extended these observations and found also elevations in other members of the NETosis-signaling pathway: r-axSpA-derived neutrophils displayed enhanced proinflammatory cytokine production, along with increased NE and

MPO expression, nuclear translocation of PAD4, and citrullination of histone H3. Thereupon, these key elements required for efficient NET generation could further serve as potential targets for new therapeutic approaches.

Subsequently, we evaluated the potential of using NETosis-derived products as r-axSpA-related biomarkers. We found that circulating levels of cell-free DNA,

nucleosomes and elastase were up-regulated in this disorder and that all of them had evident ability to distinguish between r-axSpA patients and HDs. The combination of the three NETotic markers as a panel also demonstrated to be a disease-related biomarker in r-axSpA. To additionally explore the relationship of these biomarkers with the pathology of r-axSpA, we next performed correlation studies, and confirmed that NETosis-derived products are related to clinical inflammatory parameters. Specifically, we found that levels of circulating cell-free NET components were significantly correlated with plasma cytokine levels (TNF- α , IL-1 β), CRP and ESR. In addition, association studies demonstrated that circulating cell-free nucleosome levels were up-regulated in active vs. non-active r-axSpA patients. Moreover, the ROC curve analysis revealed that this component displayed value as biomarker for disease activity. These results are in concordance with a previous study performed by our group [25], where cell-free nucleosomes were showed to have diagnostic potential for discrimination of active vs. non-active RA patients.

The inhibition of NETosis in r-axSpA patients could be useful to avoid the deleterious effects of NETs on inflammation. In the context of r-axSpA, the introduction of TNF blocking drugs represented a therapeutic revolution for the pharmacological management of these patients, demonstrating to be highly effective in reducing systemic inflammation and improving the disease activity in these patients [41–43]. TNF is a cytokine that promotes inflammation, regulates the leukocyte extravasation, promotes tissue destruction and induces NET formation [24, 44]. Consequently, uncontrolled production or function of TNF has been associated to the pathology of several rheumatic diseases, including r-axSpA [45]. Recently, our research group evidenced that RA patients treated with IFX down-regulated NETosis generation in parallel to the reduction of both disease activity and the production of inflammatory mediators [25]. Based on these results and on the efficacy of anti-TNF- α drugs in r-axSpA, our present study evaluated the effects of IFX on both, NETosis generation and the toxic side effects promoted by NETs in inflammation. We found that IFX treatment not only promoted a reduction of disease activity but also a diminution NETosis generation in r-axSpA patients, evidenced by a down-regulation of circulating levels of NETosis-derived products, along with a lower expression of nuclear PAD4, and citH3 in r-axSpA-derived neutrophils. In vitro studies further unveiled the relevance of IFX in reducing NET release, as demonstrated by a decrease in DNA fibers, cell-free DNA levels, and the percentage of NE-staining neutrophils after this treatment. Besides, IFX therapy normalized the augmented inflammatory activities promoted by NETs in mononuclear cells. Additional analyses are required to elucidate the in vivo longer-term

effects of IFX in the NETosis formation and the inflammatory profile triggered.

Conclusions

Taken together, our data provide the first demonstration that NETosis is enhanced in r-axSpA patients and identify the potential role of circulating NETosis-derived products as novel complementary tools for discrimination of r-axSpA patients from HDs, and as key players for disease activity in this pathology. In addition, the present study establishes the inhibitory effect of anti-TNF- α therapy on NET formation, which parallels the reduction of disease activity. Thus, the analysis of NET generation might further have potential for the assessment of therapeutic effectiveness in r-axSpA patients.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00634-1>.

Additional file 1: Fig. S1. shows CD11b and CD62L expression on healthy neutrophils from buffy coat and after density centrifugation over Dextran-Ficoll. **Table S1.** shows a multiple linear regression analysis on potential variables (i.e. age, gender and diagnosis) associated with NETosis-derived products. **Table S2.** shows the association of disease duration with the levels of circulating cell-free NETosis markers. **Table S3.** shows the clinical and laboratory parameters of the fifteen r-axSpA patients included in the longitudinal study.

Abbreviations

AU: arbitrary units; AUC: area under the curve; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index; BASMI: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; citH3: citrullinated histone H3; CMF-DA: 5-chloromethylfluorescein diacetate; CRP: C-reactive protein; DCFHDA: dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; DHRH123: dihydroRhodamine-123; ESR: erythrocyte sedimentation rate; GSH: glutathione; HDs: healthy donors; HLA: human leukocyte antigen; IBD: inflammatory bowel disease; IFX: infliximab; IL: interleukin; MFI: mean fluorescence intensity; MPO: myeloperoxidase; mSASSS: modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score; NE: neutrophil elastase; NETs: neutrophil extracellular traps; NF- κ B: nuclear factor- κ B; NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs; OD: optical density; PAD4: peptidyl arginine deiminase 4; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; RA: rheumatoid arthritis; r-axSpA: radiographic axial spondyloarthritis; RFU: relative fluorescence units; ROC: receiver operating characteristics; ROS: reactive oxygen species; RT: room temperature; SLE: systemic lupus erythematosus; SpA: spondyloarthritis; STAT: signal transducer and activator of transcription; TNF: tumor necrosis factor; $\Delta\Psi$ m: mitochondrial membrane potential

Acknowledgments

We are grateful to Esther Peralbo-Santaella of Flow Cytometry and Advanced Optical Microscopy Unit from Central Units of Support For Research (UCAIB) at the IMIBIC (Córdoba, Spain) for providing technical assistance.

Authors' contributions

PF-U, PR-L and YJ-G conceived and designed the study. PR-L, MLL-P, MCA-A, DE-P, JAG-R, and CP-S acquired the data. PR-L, MLL-P, MCC-V, CL-M, CL-P, NB, JMV, AE-C, EC-E, PF-U and YJ-G analyzed and interpreted the data. All authors participated in drafting or revising the article critically for important intellectual content, and gave final approval of the final version to be published.

Funding

This work was supported by the "Junta de Andalucía" [grant number PI-0314-2012], the Spanish Foundation of Rheumatology and the Andalusian Foundation of Rheumatology. CL-P was supported by a contract from the

Spanish Junta de Andalucía, Nicolas Monardes contract. NB was supported by the Ministry of Health postdoctoral fellowship [Institute of Health Carlos III (ISCIII)], Miguel Servet Contract. PR-L was supported by a "Juan de la Cierva-Formación" contract (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness; FJCI-2016-28173). YJ-G was supported by a contract from the University of Cordoba (Co-financing of the Research Plan of the University of Cordoba and the Operating Program of the European Regional Development Funds (ERDF) for Andalusia). The funders had no role in the study design, data collection, analysis, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Availability of data and materials

All supporting data have been shown in the current manuscript and its additional file.

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted with the approval of the Ethics Committee from the Reina Sofia University Hospital (Córdoba-Spain). Written informed consent was obtained from all participants.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. ²Unidad de Gestión Clínica Reumatología, Hospital Universitario Reina Sofia, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. ³Departamento de Medicina (Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología), Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. ⁴Unidad de Gestión Clínica Endocrinología y Nutrición, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Campus Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain. ⁵Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 3ª planta, 14014 Córdoba, Spain.

Received: 21 October 2019 Accepted: 26 February 2020

Published online: 17 April 2020

References

- Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011;377(9783):2127–37.
- Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007;369(9570):1379–90.
- Lopez-Medina C, Molto A. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):241–53.
- Ronneberger M, Schett G. Pathophysiology of spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(5):416–20.
- Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(Suppl 3):iii8–18.
- Rezaieanesh A, Abdolmaleki M, Abdolmohammadi K, Aghaei H, Pakdel FD, Fatahi Y, Soleimanifar N, Zavvar M, Nicknam MH. Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomed Pharmacother*. 2018;100:198–204.
- Repo H, Leirisalo-Repo M, Koivuranta-Vaara P. Exaggerated inflammatory responsiveness plays a part in the pathogenesis of HLA-B27 linked diseases—hypothesis. *Ann Clin Res*. 1984;16(1):47–50.
- Atagunduz P, Appel H, Kuon W, Wu P, Thiel A, Kloetzel PM, Sieper J. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(3):892–901.
- Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W, Li JM. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012;7(4):e31000.
- Wang C, Liao Q, Hu Y, Zhong D. T lymphocyte subset imbalances in patients contribute to ankylosing spondylitis. *Exp Ther Med*. 2015;9(1):250–6.
- Wu Y, Ren M, Yang R, Liang X, Ma Y, Tang Y, Huang L, Ye J, Chen K, Wang P, Shen H. Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R29.
- Ugan Y, Naziroglu M, Sahin M, Aykur M. Anti-tumor necrosis factor alpha (infliximab) attenuates apoptosis, oxidative stress, and calcium ion entry through modulation of Cation channels in neutrophils of patients with Ankylosing spondylitis. *J Membr Biol*. 2016;249(4):437–47.
- Boyras I, Koc B, Boyaci A, Tutoglu A, Sarman H, Ozkan H. Ratio of neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte in patient with ankylosing spondylitis that are treating with anti-TNF. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2912–5.
- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657–70.
- Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013;210(7):1283–99.
- Hahn S, Giaglis S, Chowdhury CS, Hosli I, Hasler P. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):439–53.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231–41.
- Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*. 2010;36. <https://doi.org/10.3791/1724>.
- Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine a. *PLoS One*. 2014;9(5):e97088.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010;191(3):677–91.
- Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, Hu J, Wang Y, Wagner DD. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(21):8674–9.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009;184(2):205–13.
- Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111.
- Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Jimenez-Gomez Y, Arias-de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, Rodriguez-Ariza A, Castro-Villegas MC, Ortega-Castro R, Segui P, Martinez C, Gonzalez-Conejero R, Rodriguez-Lopez S, Gonzalez-Reyes JA, Villalba JM, Collantes-Estevez E, Escudero A, Barbarroja N, Lopez-Pedraza C. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun*. 2017;82:31–40.
- Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1612–20.
- Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9813–8.
- Braun J, Sieper J, Breban M, Collantes-Estevez E, Davis J, Inman R, Marzo-Ortega H, Mielants H. Anti-tumour necrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience. *Ann Rheum Dis*. 2002(Suppl 3):iii51–iii60.
- Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, Braun J, Chou CT, Collantes-Estevez E, Dougados M, Huang F, Gu J, Khan MA, Kirazli Y, Maksymowych WP, Mielants H, Sorensen IJ, Ozgocmen S, Rousou E, Valle-Onate R, Weber U, Wei J, Sieper J. The development of assessment of SpondyloArthritis international society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):777–83.
- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing spondylitis disease activity index. *J Rheumatol*. 1994;21(12):2286–91.

31. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, Jenkinson T. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing spondylitis functional index. *J Rheumatol*. 1994;21(12):2281–5.
32. Jenkinson TR, Mallorie PA, Whitelock HC, Kennedy LG, Garrett SL, Calin A. Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS). The Bath AS metrology index. *J Rheumatol*. 1994;21(9):1694–8.
33. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(1):127–9.
34. Nauseef WM. Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol Biol*. 2007;412:15–20.
35. Ruiz-Limon P, Ortega R, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MDC, Perez-Sanchez C, Jimenez-Gomez Y, Peralbo-Santaella E, Font P, Ruiz-Vilches D, Ferrin G, Collantes-Estevez E, Escudero-Contreras A, Lopez-Pedraza C, Barbarroja N. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res*. 2017;183:87–103.
36. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(9):2499.
37. Braun J, Pham T, Sieper J, Davis J, van der Linden S, Dougados M, van der Heijde D. International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):817–24.
38. Bjornsdottir H, Welin A, Michaelsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, Sundqvist M, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:1024–35.
39. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010;207(9):1853–62.
40. Couto D, Ribeiro D, Freitas M, Gomes A, Lima JL, Fernandes E. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species by the prodrug sulfasalazine and its metabolites 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine. *Redox Rep*. 2010;15(6):259–67.
41. Brandt J, Haibel H, Cornely D, Golder W, Gonzalez J, Reddig J, Thriene W, Sieper J, Braun J. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum*. 2000;43(6):1346–52.
42. Brandt J, Haibel H, Sieper J, Reddig J, Braun J. Infliximab treatment of severe ankylosing spondylitis: one-year followup. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2936–7.
43. Brandt J, Khariouzov A, Listing J, Haibel H, Sorensen H, Grassnickel L, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(6):1667–75.
44. Feldmann M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:1–27.
45. Francois RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(6):713–20.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Assessment of the relationship between estimated cardiovascular risk and structural damage in patients with axial spondyloarthritis

María Lourdes Ladehesa-Pineda*^{ID}, Iván Arias de la Rosa*, Clementina López-Medina^{ID}, María del Carmen Castro-Villegas, María del Carmen Ábalos-Aguilera, Rafaela Ortega-Castro^{ID}, Ignacio Gómez-García^{ID}, Pedro Seguí-Azpilcueta, Yolanda Jiménez-Gómez^{ID}, Alejandro Escudero-Contreras, Chary López-Pedreira, Nuria Barbarroja*^{ID}, and Eduardo Collantes-Estévez*; for the CASTRO Working Group

Abstract

Aims: To evaluate the association of estimated cardiovascular (CV) risk and subclinical atherosclerosis with radiographic structural damage in patients with axial spondyloarthritis (axSpA).

Methods: Cross-sectional study including 114 patients axSpA from the SpA registry of Córdoba (CASTRO) and 132 age- and sex-matched healthy controls (HCs). Disease activity and the presence of traditional CV risk factors were recorded. The presence of atherosclerotic plaques and carotid intima media thickness (cIMT) were evaluated through carotid ultrasound and the SCORE index was calculated. Radiographic damage was measured through modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score (mSASSS). The association between mSASSS and SCORE was tested using generalized linear models (GLM), and an age-adjusted cluster analysis was performed to identify different phenotypes dependent on the subclinical CV risk.

Results: Increased traditional CV risk factors, SCORE, and the presence of carotid plaques were found in axSpA patients compared with HCs. The presence of atherosclerotic plaques and SCORE were associated with radiographic structural damage. The GLM showed that the total mSASSS was associated independently with the SCORE [β coefficient 0.24; 95% confidence interval (CI) 0.10–0.38] adjusted for disease duration, age, tobacco, C-reactive protein, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) intake. Hard cluster analysis identified two phenotypes of patients. Patients from cluster 1, characterized by the presence of plaques and increased cIMT, had a higher prevalence of CV risk factors and SCORE, and more structural damage than cluster two patients.

Conclusion: Radiographic structural damage is associated closely with increased estimated CV risk: higher SCORE levels in axSpA patients were found to be associated independently with mSASSS after adjusting for age, disease duration, CRP, tobacco and NSAID intake.

Keywords: axial spondyloarthritis, cardiovascular risk, carotid intima media thickness, disease activity, structural damage

Received: 29 June 2020; revised manuscript accepted: 26 November 2020.

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory disorders that present different but

related phenotypes including ankylosing spondylitis (AS) [currently known as radiographic axial spondyloarthritis (r-axSpA)], psoriatic arthritis

Ther Adv Musculoskel Dis

2020, Vol. 12: 1–15

DOI: 10.1177/
1759720X20982837

© The Author(s), 2020.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Correspondence to:
María Lourdes Ladehesa Pineda

Department of
Rheumatology of "Reina
Sofia University Hospital",
Avda. Menéndez Pidal s/n,
Córdoba, 14004, Spain

Maimonides Research
Institute of Biomedical
Medicine from Córdoba
(IMIBIC)/University of
Córdoba, Córdoba, Spain
lourdesladehesapineda@gmail.com

Iván Arias de la Rosa
**María del Carmen Castro-
Villegas**
**María del Carmen Ábalos-
Aguilera**

Rafaela Ortega-Castro
Ignacio Gómez-García
Pedro Seguí-Azpilcueta
Yolanda Jiménez-Gómez
**Alejandro Escudero-
Contreras**

Chary López-Pedreira
**Eduardo Collantes-
Estévez**

Reina Sofia University
Hospital/Maimonides
Research Institute of
Biomedical Medicine
from Córdoba (IMIBIC)/
University of Córdoba,
Córdoba, Spain

Clementina López-Medina
Reina Sofia University
Hospital/Maimonides
Research Institute of
Biomedical Medicine
from Córdoba (IMIBIC)/
University of Córdoba,
Córdoba, Spain

Rheumatology
Department, Cochin
Hospital from Paris/
INSERM U:1153, Clinical
Epidemiology and
Biostatistics, Paris, France

Nuria Barbarroja
Reina Sofia University
Hospital/Maimonides
Research Institute of
Biomedical Medicine
from Córdoba (IMIBIC)/
University of Córdoba,
Córdoba, Spain

(PsA), arthritis related to inflammatory bowel disease, reactive arthritis, and a subgroup of juvenile idiopathic arthritis.¹ According to the predominant manifestations, spondyloarthritis can also be classified as axial SpA (axSpA) or peripheral SpA.^{2,3}

The prevalence rate of axSpA in the population varies between 0.1% and 1.4%.⁴ This disease is related to the presence of some comorbidities, being most common in patients with osteoporosis or low bone mineral density, which is related directly to ankylosis, immobilization, and inflammation,⁵ and cardiovascular (CV) involvement, especially atherosclerosis.⁶ The CV burden in inflammatory rheumatic diseases has been well described,⁷ and recommendations have been developed advising the use of antihypertensives and statins in compliance with national guidelines. Regarding non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and biologics, the recommendation is to be cautious in certain patients with CV disease.⁸ Recently, this CV burden has been highlighted in the context of axSpA, with most studies agreeing on the presence of a higher risk in subjects with r-axSpA than in the general population.^{9,10} CV risk factors and subclinical atherosclerosis are found more frequently in patients with axSpA. In addition, it has been suggested that CV risk associated with PsA and r-axSpA could be underestimated despite the use of guideline-recommended risk scores.¹¹

The progression of structural damage in r-axSpA patients is unpredictable and has been described in early as well as in very advanced older patients.¹² This spine damage is most prevalent and severe in patients with longstanding r-axSpA, although the relative contribution of radiographic damage to functional limitations decreases in patients with a longer duration of disease.¹³

The presence of elevated C-reactive protein (CRP) at diagnosis and during disease evolution is a traditional risk factor for radiographic progression, together with male sex, positive HLA B27, presence of radiographic damage at baseline (especially syndesmophytes), smoking, mechanical stress, obesity, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), and bone marrow oedema (BME) on magnetic resonance imaging (MRI).¹⁴⁻¹⁷

The impact of elevated CRP on traditional CV risk factors, and thus on an increased CV risk and CV mortality, has been demonstrated,^{18,19} and studies have shown that CRP concentration is associated with an initial absence of vascular disease and risk of coronary heart disease, ischaemic stroke, and deaths from vascular and non-vascular diseases,²⁰ as well as with endothelial dysfunction.²¹ Treating inflammation in patients with r-axSpA and thus decreasing CRP levels could lead to a reduction of coronary artery disease and atherosclerosis.²²

On the other hand, age is an independent and major risk factor for CV disease (CVD).²³ To date, no study has evaluated the contribution of structural damage to the increased CV risk and presence of subclinical atherosclerosis in axSpA patients, regardless of age.

A deeper knowledge about the association between the characteristics related to axSpA, such as structural damage, with the increased CV risk present in these patients is needed to recognize patients at higher risk and establish earlier treatment and lifestyle measures to prevent radiographic progression and benefit the patients from a CV point of view.

The objective of this study was to evaluate the association between the estimated CV risk factors and subclinical atherosclerosis with radiographic structural damage, independent of age, in a registry of patients with spondyloarthritis (CASTRO).

Methods

Study population and data collection

A total of 114 patients with axSpA according to ASAS criteria from the Córdoba Axial Spondyloarthritis Task force, Registry and Outcomes (CASTRO),² and 132 age- and sex-matched healthy controls (HCs) were selected for this cross-sectional study. Patients were recruited sequentially from a monographic SpA consult at the Rheumatology Department of Reina Sofia Hospital in Córdoba, and complete clinical history, physical examination and biochemical analysis were performed. CASTRO is composed of 182 patients, but those with a history of CV events (ischaemic heart disease, cerebrovascular accident, peripheral arterial disease, or heart failure) were excluded from this specific study.

The following data were collected: (1) demographic variables: sex, age and body mass index (BMI); (2) clinical data: disease duration, presence of HLA-B27, NSAIDs intake, radiographic sacroiliitis measured by simple radiography, structural damage determined by the modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score (mSASSS) index,²⁴ disease activity measured by erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP, BASDAI index, ASDAScrp index, extra-articular manifestations and comorbidities; and (3) CV risk factors: CV risk was determined using the SCORE index.^{25,26} Carotid ultrasound was performed by an expert radiologist with a Philips Epiq-7 system and a 5–14MHz broadband linear transducer using B-mode, duplex and color methods. The presence of atherosclerotic plaques was assessed and measured when present. Mean distal common carotid intima-media thickness (cIMT) measurement was evaluated using standardized criteria.²⁷

For axSpA patients, radiographs of the cervical spine, lumbar spine, and sacroiliac joints were obtained at the time of CV risk assessment. Lateral views of the cervical and lumbar spine were scored according to the mSASSS index.²⁸ Sacroiliitis was scored from right side and left side pelvic radiographs using the modified New York criteria. Sacroiliitis and the mSASSS were scored by two rheumatologist trained who were blinded to the patient characteristics. The intraclass correlation coefficient (ICC) score for agreement between readers was 0.997 [95% confidence interval (CI) 0.996–0.998] ($p < 0.001$) for total mSASSS, 0.991 (95% CI 0.987–0.994) ($p < 0.001$) for cervical mSASSS, and 0.992 (95% CI 0.989–0.995) ($p < 0.001$) for lumbar mSASSS. Due to the excellent agreement between both readers, the score from the senior reader was used for the analysis.

To measure the persistence of inflammation, CRP levels (mg/l) were recorded retrospectively once, twice, or three times during the 5 years prior to study and in the moment of the study, so at least six determinations of CRP levels for each patient was available in all axSpA patients. A patient was considered to have persistent inflammation in case of increased CRP levels (> 10 mg/l) in at least 50% of the determinations during the previous 5 years, i.e., if four or more of those six determinations were elevated.

The study was approved by the Ethics Committee at the Reina Sofia University Hospital (Protocol code PI-0139-2017), and each participant signed

an informed consent form to be included in the study.

Statistical analysis

Data were collected and analysed using SPSS software version 25.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive study of the variables was carried out, calculating absolute and relative frequencies for the qualitative variables and arithmetic mean and standard deviation (SD) for the quantitative variables. The 95% CI was estimated. Independent samples *t* test and chi-square test were used to compare demographic and CV characteristics between the axSpA patients and HCs and in cluster groups. The linear relationship between the variables was measured by Pearson's linear correlation coefficient in all the groups and then in groups based on the median age. Because age, disease duration, tobacco, CRP, and NSAIDs intake are biologically associated with both the structural damage and the CV risk in axSpA patients, a generalized linear model (GLM) was performed to determine the association between mSASSS and SCORE as well as with the presence of atheroma plaques by adjusting for these variables. For the association between mSASSS and SCORE, we used a Gaussian GLM since the dependent variable was not normal. For the association between mSASSS and atherosclerotic plaques, we used a logistic regression since the dependent variable was binary (yes/no).

Furthermore, to establish different phenotypes of patients according to the carotid intima media thickness (cIMT) and the presence of atherosclerotic plaques, we performed a cluster analysis with the hard clustering method, which was adjusted for age. All comparisons were bilateral considering $p \leq 0.05$ as a significant result.

Results

CV risk in axSpA patients

Among the 114 axSpA patients and the 132 matched controls, 61.2% were male, with a mean age of 44.35 (11.55) years and 92.7% of axSpA patients were under NSAIDs. No patient was treated with biologic therapy. The demographic and clinical characteristics of the study participants are shown in Table 1.

Regarding characteristics related to CV risk, axSpA patients had significantly increased smoking habits,

Table 1. Demographic and clinical details and characteristics related to cardiovascular risk of axial spondyloarthritis patients and healthy controls.

	Patients (n=114)	HCs (n=132)	p-value
Age (years)	45.73 (12.15)	43.09 (10.86)	0.077
Sex (males)	77 (67.50)	71 (55.50)	0.054
HLA B27 status (positive)	93 (82.30)	4 (6.70)	<0.001*
Family history for SpA	38 (33.60)	2 (11.10)	
Radiographic sacroiliitis	90 (81.10)		
Inflammatory back pain	96 (85.71)	2 (10.50)	
Arthritis	16 (14.10)	0	
Psoriasis	13 (11.40)	0	
BMI (kg/m ²)	26.62 (4.25)	20.13 (9.40)	<0.001*
Disease duration (years)	19.24 (13.36)		
Global VAS	43.33 (25.19)		
ASDAS-CRP	2.44 (0.93)		
ASAS HI	4.75 (4)		
BASDAI	3.68 (2.13)		
BASFI	2.85 (2.48)		
BASMI	3.10 (1.80)		
CRP (mg/l)	5.75 (7.76)	1.43 (1.72)	<0.001*
NSAIDs	102 (92.70)	2 (1.70)	
Biological treatment	0	0	
Total mSASSS	15.26 (17.18)		
Cervical mSASSS	7.27 (9.09)		
Lumbar mSASSS	8.09 (9.38)		
Smoking status	37 (32.7)	12 (14.3)	0.003*
Obesity	23 (20.7)	4 (6.6)	0.015*
Hypertension	21 (18.6)	2 (1.6)	<0.001*
Type 2 diabetes	2 (1.8)	0	0.138
Glucose (mg/dl)	83.60 (14.43)	85.98 (13.94)	0.244
Insulin (mU/l)	6.40 (3.99)	8.71 (5.25)	0.005*
Insulin resistance	1.42 (1.09)	1.89 (1.29)	0.008*
Total Cholesterol (mg/dl)	190.02 (31.37)	197.79 (30.64)	0.065
HDL-cholesterol (mg/dl)	55.42 (14.81)	56.74 (14.89)	0.514
LDL-cholesterol (mg/dl)	114.46 (29.7)	121.50 (24.63)	0.058
Triglycerides (mg/dl)	101.10 (60.98)	97.79 (53.24)	0.668

(Continued)

Table 1. (Continued)

	Patients (n = 114)	HCs (n = 132)	p-value
Apo A (mg/dl)	143.09 [21.13]	150.75 [27.33]	0.024*
Apo B (mg/dl)	80.02 [17.56]	89.43 [25.42]	0.002*
Apo B/Apo A risk	0.58 [0.18]	0.61 [0.19]	0.186
Atherogenic risk	12 [17.1]	1 [7.1]	0.685
Uric acid (mg/dl)	5.07 [1.31]	5.06 [1.25]	0.972
Atherosclerotic carotid plaques	16 [16.3]	2 [3.3]	0.011*
Right cIMT (mm)	0.54 [0.12]	0.57 [0.14]	0.326
Left cIMT (mm)	0.56 [0.13]	0.57 [0.09]	0.577
SCORE			0.100
Low risk	73 [70.9]	19 [86.4]	
Moderate, high and very high risk	30 [29.1]	3 [13.6]	

Data are shown as mean (standard deviation) or frequency (percentage).
*Significant differences.
Apo A, apolipoprotein A; Apo B, apolipoprotein B; ASAS HI, Assessment of Spondyloarthritis International Society Health Index; ASDAS-CRP, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C Reactive Protein; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; BMI, body mass index; cIMT, carotid intima-media thickness; CRP, C-reactive protein; HCs, healthy controls; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score; NSAIDs, non steroidal antiinflammatory drugs; SpA, spondyloarthritis; VAS, visual analogic scale.

hypertension, obesity, type 2 diabetes rates, and atherogenic risk compared with those of the age- and sex-matched control group. No differences were found in terms of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, ApoB/ApoA ratio, or uric acid levels (Table 1).

The levels of the systematic coronary risk evaluation (SCORE), which predicts the individual absolute risk for fatal CV events, were higher in the axSpA group although it did not reach statistical significance. However, when subjects were classified by low (<10% of suffering a CV event), moderate (10–20%), high (20–30%), and very high risk (>30%) depending on the SCORE levels, we observed that, among axSpA patients, 70.9% had a low CV risk and 29.1% displayed high CVD risk (moderate, high, and very high), while 86.4% of HCs were classified as low CV risk and 13.6% were classified as high CV risk (Table 1).

Association between the estimated CV risk and structural damage

In axSpA patients, correlation studies showed that SCORE correlated significantly with

structural damage: total mSASSS (Figure 1A), cervical and lumbar mSASSS (Figure 1B and C), syndesmophytes (Figure 1D), and bone bridges (Figure 1E).

In addition, the presence of atherosclerotic carotid plaques was associated with increased total mSASSS (Figure 2A), cervical (Figure 2B) and lumbar (Figure 2C) mSASSS, syndesmophytes (Figure 2D), and bone bridges (Figure 2E).

Correlation analysis was also performed in two groups according to the median age (47 years), and it was observed that the correlation between total mSASSS and SCORE was maintained in both groups: in the group with axSpA patients aged ≤ 47 years old, SCORE significantly correlated with total mSASSS ($r = 0.26$, $p = 0.049$) and in patients aged > 47 years old, SCORE correlated with total mSASSS ($r = 0.459$, $p = 0.002$).

Besides, after adjusting for disease duration, smoking status, increased CRP levels (at least three determinations over the last 5 years), and NSAIDs intake, the total mSASSS was associated independently with SCORE: 1 point in the total

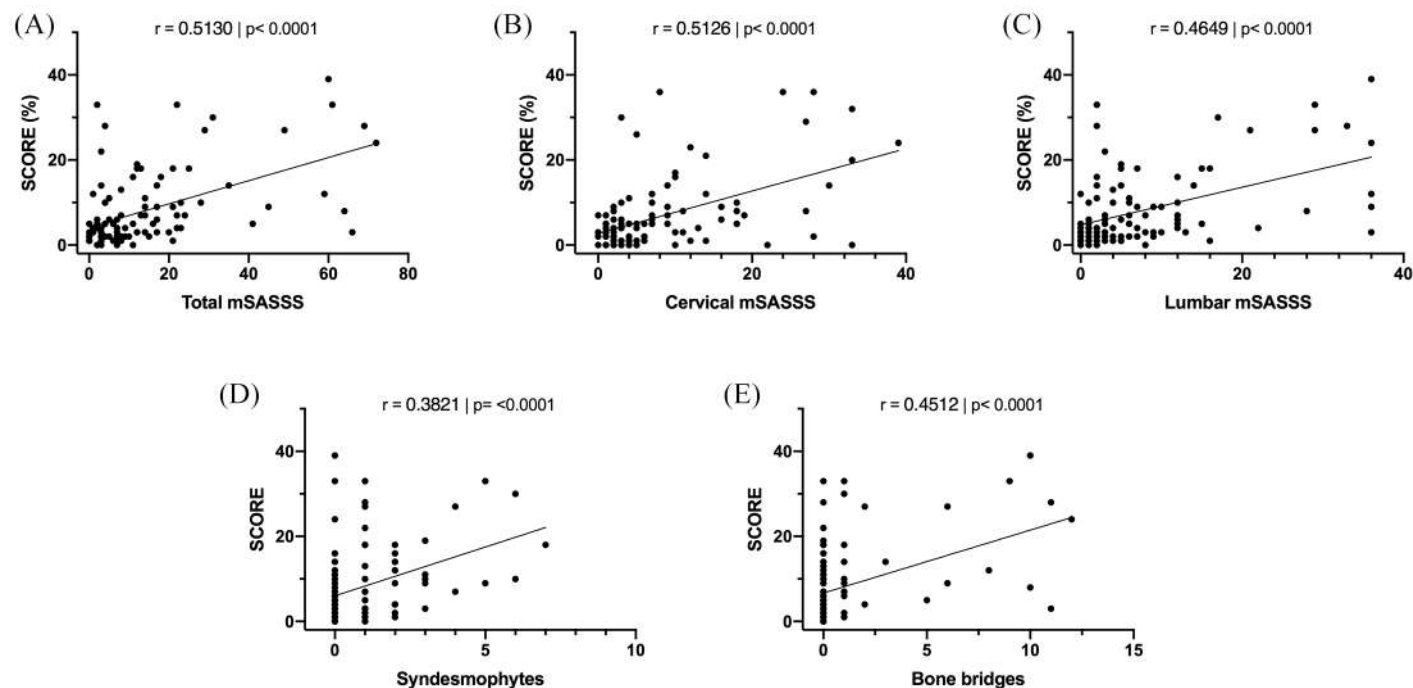


Figure 1. Association between SCORE levels and structural damage in axSpA patients. (A) Correlation between SCORE and total mSASSS. (B) Correlation between SCORE and cervical mSASSS. (C) Correlation between SCORE and lumbar mSASSS. (D) Correlation between SCORE and number of syndesmophytes. (E) Correlation between SCORE and number of bone bridges.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

axSpA, axial spondyloarthritis; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score.

mSASSS increased the SCORE by 0.24 points, and it seems that the cervical mSASSS has the most influence on the SCORE: 1 point in the cervical mSASSS increases the SCORE by 0.42 points, these differences being statistically significant (Table 2). Total mSASSS is also associated significantly with atherosclerotic plaques presence after adjusting for disease duration, smoking status, CRP, and NSAIDs intake, and 1 point in the total mSASSS increases the risk for atherosclerotic plaques 1.05 (1.01–1.12) times (Table 3).

Cluster analysis

Cluster analysis including the presence of carotid plaques and right and left cIMT levels as variables (Figure 3A–C) distinguished two different phenotypes of patients according to their CV risk factor prevalence. These groups were adjusted for age. Carotid ultrasound data were used to stratify patients, since according to our previous results, SCORE does not totally reflect the presence of subclinical atherosclerosis.

Thus, cluster 1 was characterized by a significant increase in CV risk compared with that of cluster

2, showing higher rates of smoking habit, obesity, atherogenic index, insulin resistance, and type 2 diabetes (Figure 3D).

Likewise, cluster 1 had significantly increased levels of SCORE compared with those of cluster 2 (Figure 4A). Of note, cluster 1, having no difference in mean age from that of cluster 2, showed significantly augmented levels of total mSASSS (Figure 4B), cervical mSASSS (Figure 4C), lumbar mSASSS (Figure 4D), and the presence of bone bridges (Figure 4E).

Thus, patients included in cluster 1 had increased levels of SCORE, along with higher levels of right cIMT (Figure 4F) and total mSASSS (Figure 4G).

Discussion

Age and tobacco are determining factors in the development of CV disease in the general population as well as in the progression of radiographic damage in patients with axSpA.^{12,23} Our study shows for the first time, to our knowledge, that axSpA patients with more structural damage display increased predicted

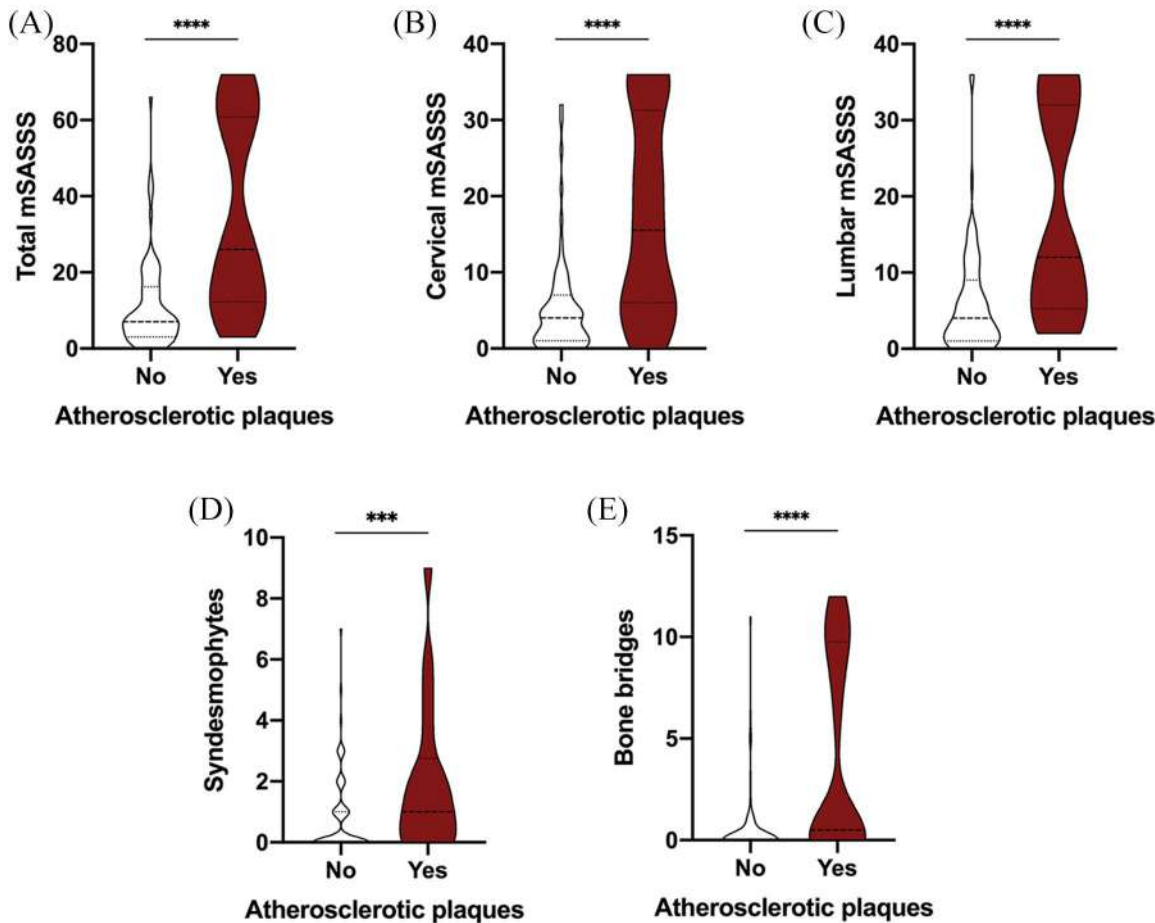


Figure 2. Presence of atherosclerotic carotid plaques in axSpA patients according to structural damage. (A) Total mSASSS in axSpA patients with or without atherosclerotic plaques. (B) Cervical mSASSS in axSpA patients with or without atherosclerotic plaques. (C) Lumbar mSASSS in axSpA patients with or without atherosclerotic plaques. (D) Number of syndesmophytes in axSpA patients with or without atherosclerotic plaques. (E) Number of bone bridges in axSpA patients with or without atherosclerotic plaques.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

axSpA, axial spondyloarthritis; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score.

CV risk, independently of disease duration, age, and smoking habit.

First, we confirmed the presence of an increased estimated CV risk in axSpA patients, as has been demonstrated in several previous studies.²⁹ Thus, smoking habits have been associated with poorer outcomes in terms of structural damage, treatment response, and quality of life in SpA patients.^{30,31} Hypertension was found to be the most prevalent CV disease risk factor in SpA patients, particularly in Northern European countries, according to data from the COMOSPA study.³² Regarding NSAID consumption, most patients included in our study were taking NSAIDs. Recent studies have highlighted the

connection between increased BMI and both axial and peripheral new bone formation and enthesal inflammation,³³ although it has been proposed that obesity prevalence is higher in patients with peripheral forms of SpA.³⁴ In addition, type 2 diabetes has also been linked to peripheral forms of SpA and psoriatic arthritis.^{35,36} Another factor, atherogenic risk, has previously been reported to be higher in axSpA patients,^{37,38} and we observed that atherogenic risk was also increased significantly in our cohort of axSpA patients.

Second, the SCORE index is the tool recommended by the 2016 European Society of Cardiology (ESC) guidelines on CV disease

Table 2. Association between mSASSS and SCORE adjusting for age, smoking status, CRP, NSAIDs intake and disease duration.

	Crude model		Adjusted for age and smoking		Adjusted for age, smoking and elevated CRP*		Adjusted for age, smoking, elevated CRP* and NSAIDs intake		Adjusted for disease duration, smoking, elevated CRP* and NSAIDs intake	
	β coefficient (95% CI)	<i>p</i> value	β coefficient (95% CI)	<i>p</i> value	β coefficient (95% CI)	<i>p</i> value	β coefficient (95% CI)	<i>p</i> value	β coefficient (95% CI)	<i>p</i> value
Total mSASSS	0.27 (0.18–0.36)	<0.001	0.11 (0.03–0.20)	0.007	0.17 (0.05–0.29)	0.009	0.16 (0.03–0.28)	0.018	0.24 (0.10–0.38)	0.001
Cervical mSASSS	0.53 (0.35–0.70)	<0.001	0.24 (0.08–0.39)	0.003	0.31 (0.07–0.53)	0.012	0.29 (0.05–0.53)	0.022	0.42 (0.14–0.71)	0.006
Lumbar mSASSS	0.44 (0.28–0.61)	<0.001	0.16 (0.18–0.31)	0.030	0.25 (0.06–0.45)	0.014	0.24 (0.04–0.45)	0.024	0.39 (0.16–0.61)	0.002

*Elevated CRP at more than 50% of the time-points during 5years.

CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Table 3. Association between mSASSS and atherosclerotic plaques adjusting for age, smoking status, CRP, NSAIDs intake and disease duration.

	Crude model		Adjusted for age and smoking		Adjusted for age, smoking and elevated CRP*		Adjusted for age, smoking, elevated CRP* and NSAIDs intake		Adjusted for disease duration, smoking, elevated CRP* and NSAIDs intake	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Total mSASSS	1.07 (1.04–1.11)	<0.001	1.04 (1.01–1.08)	0.019	1.05 (0.99–1.11)	0.076	1.05 (0.99–1.12)	0.096	1.05 (1.01–1.12)	0.034
Cervical mSASSS	1.13 (1.07–1.20)	<0.001	1.08 (1.02–1.56)	0.019	1.07 (0.98–1.17)	0.128	1.06 (0.98–1.16)	0.155	1.09 (1.00–1.19)	0.042
Lumbar mSASSS	1.11 (1.06–1.18)	<0.001	1.07 (1.01–1.14)	0.036	1.09 (1.00–1.21)	0.062	1.09 (0.99–1.22)	0.070	1.10 (1.01–1.22)	0.037

*Elevated CRP at more than 50% of the time-points during 5years.

CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

prevention to estimate the individual's absolute risk for fatal CV events.³⁹ SCORE includes age, sex, lipid levels, smoking, and blood pressure, with age being the variable with the greatest influence. In our registry, we found that the SCORE levels were increased in axSpA patients when compared with those of age-matched HCs, although this difference did not reach statistical significance, which might be because SCORE could underestimate CV risk in SpA patients.⁴⁰ Despite this, when patients and controls were classified by low, moderate, high, and very high CV risk according to the SCORE levels, we

observed that, among axSpA patients, 70.9% had a low CV risk, 18.4% had moderate CV risk, 6.8% had high, and 3.9% had very high CV risk, which differed from the CV risk present in HCs, with 86.4% classified as having low CV risk and 13.6% classified as having moderate CV risk.

In our study, structural damage was measured in terms of total, cervical, and lumbar mSASSS, which, to date, is the most validated and broadly used tool for measuring radiographic progression in r-axSpA because of its good correlation with indexes of disease signs and symptoms, spinal

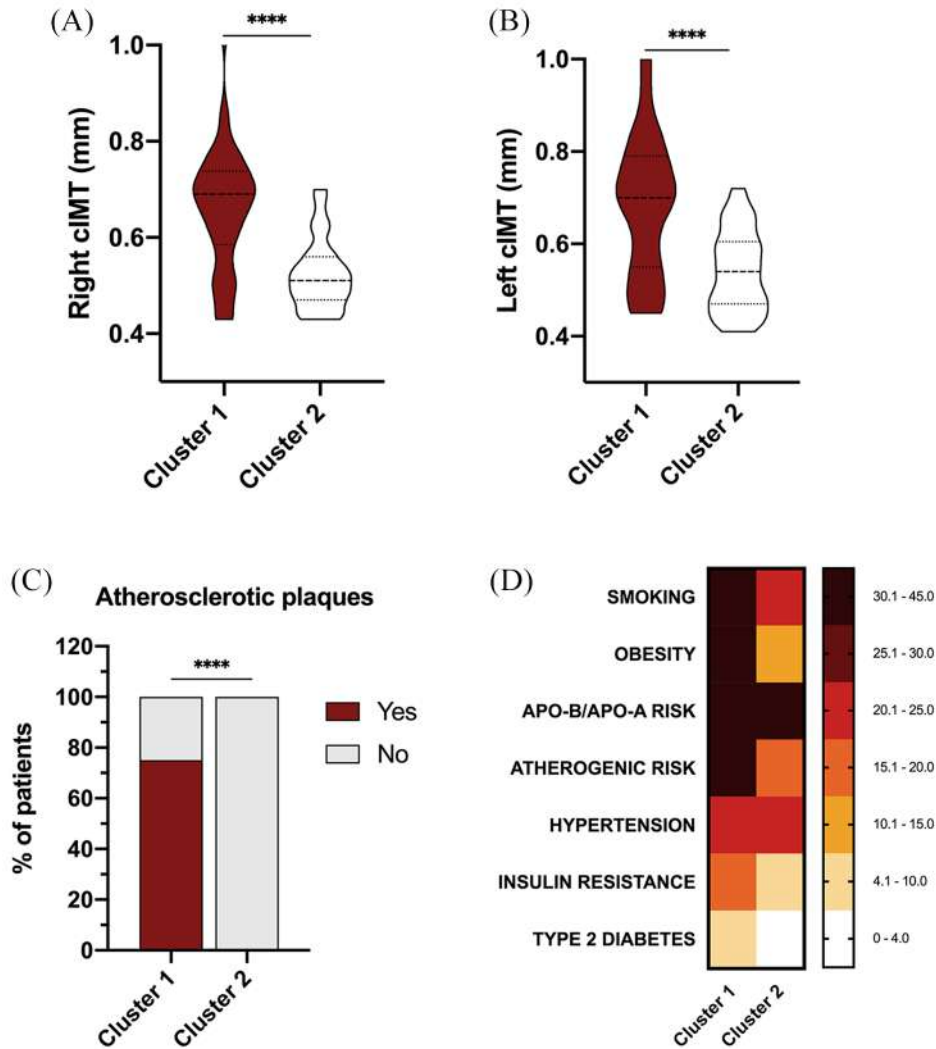


Figure 3. Cluster analysis recognizes two different phenotypes of axSpA patients according to their cardiovascular risk burden in terms of presence of carotid plaques and right and left cIMT levels. (A) Levels of right cIMT in cluster 1 and cluster 2. (B) Levels of left cIMT in cluster 1 and cluster 2. (C) Presence/absence of atherosclerotic plaques in cluster 1 and cluster 2. (D) Cluster analysis including presence of carotid plaques and right and left cIMT levels as variables distinguished two different phenotypes of patients with different cardiometabolic risk factors prevalence.

**** $p < 0.0001$.

Apo A, apolipoprotein A; Apo B, apolipoprotein B; axSpA, axial spondyloarthritis; cIMT, carotid intima media thickness.

mobility, and physical function.²⁴ The presence of syndesmophytes and bone bridges, which are the most relevant structural changes in r-axSpA according to numerous studies,¹⁴ was also evaluated. Thus, characteristics closely related to CV risk, such as SCORE levels, presence of atherosclerotic plaques, and right and left cIMT levels, were found to be associated with mSASSS and the presence of syndesmophytes and bone bridges, implying an association between radiographic damage and CV risk. In this sense, Kang

and colleagues found an association between radiographic progression in the spine and a high estimated 10-year CV disease risk measured by Framingham risk score.⁴¹

Importantly, Rueda Gotor *et al.* demonstrated that the SCORE underestimates the real CV risk of patients with axSpA, and proposed the use of additional tools, such as carotid ultrasound, to improve the identification of axSpA patients at high risk of developing CV disease.⁴²⁻⁴⁴ In this

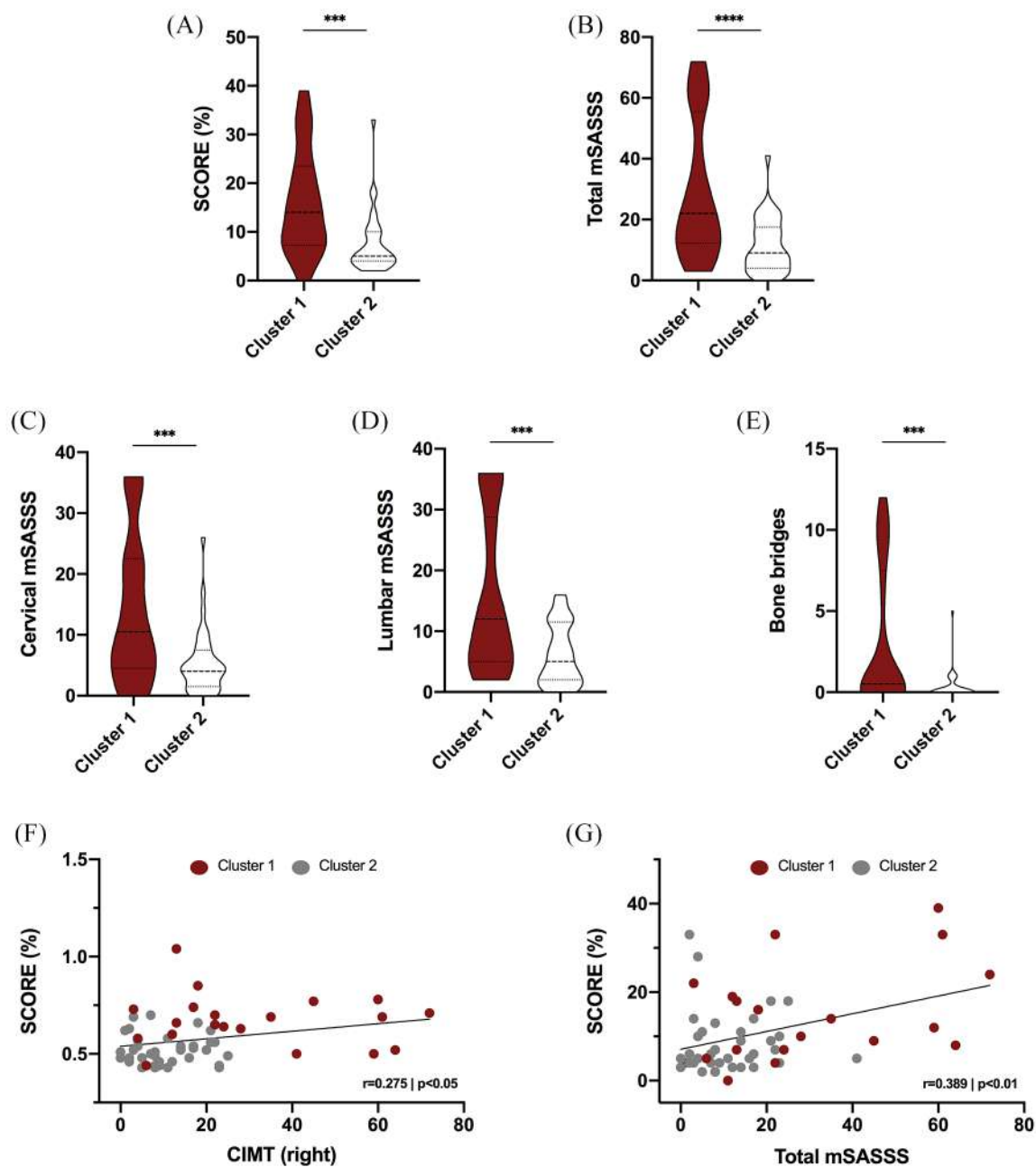


Figure 4. SCORE and structural damage in clusters recognizing two different phenotypes of axSpA patients according to the subclinical cardiovascular risk: atherosclerosis. (A) SCORE in cluster 1 and cluster 2. (B) Total mSASSS in cluster 1 and cluster 2. (C) Cervical mSASSS in cluster 1 and cluster 2. (D) Lumbar mSASSS in cluster 1 and cluster 2. (E) Number of bone bridges in cluster 1 and cluster 2. (F) Correlation between SCORE and right CIMT in cluster 1 and cluster 2. (G) Correlation between SCORE and total mSASSS in cluster 1 and cluster 2. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. axSpA, axial spondyloarthritis; CIMT, carotid intima media thickness; mSASSS, modified Stoke ankylosing spondylitis spinal score.

context, we decided to perform cluster analysis including the presence of carotid plaques and right and left cIMT levels as variables. Interestingly, our cluster analysis based on the

presence of carotid plaques and right and left cIMT levels allowed us to distinguish two different phenotypes of patients according to their CV risk factor prevalence, and these two different

groups were adjusted for age. In the first cluster, with a higher number of atherosclerotic plaques and thicker carotid intima media, there was an increased prevalence of smoking, obesity, atherogenic index, insulin resistance and type 2 diabetes, with significantly increased levels of SCORE, but, surprisingly, this cluster also showed significantly augmented levels of total, cervical, and lumbar mSASSS, and an increased presence of bone bridges with a higher grade of left and right sacroiliitis.

A study by Eriksson *et al.* compared the prevalence of CV events in rheumatoid arthritis (RA) and axSpA patients, and found that the risk was similar for stroke, but axSpA patients had a lower risk for thrombotic events and acute coronary syndromes.⁴⁵ While in RA the increased CV risk and its association with the inflammatory burden are well described,⁴⁶⁻⁴⁸ few studies have evaluated this association in axSpA. In our study, persistent inflammation was defined in case of abnormal CRP levels in >50% of the determinations during the last 5 years. We found that axSpA with persistent inflammation displayed increased right and left cIMT and a higher number of syndesmophytes, which points to CRP as a link between increased CV risk and structural damage in these patients.

The role of CRP in structural damage in axSpA patients has already been defined, meaning that axial radiographic progression is a result of chronic inflammation in axSpA patients,⁴⁹⁻⁵¹ and our study not only supports this fact but also highlights inflammation as a more important link between the radiographic damage and CV risk than age. Indeed, in the relationship between structural damage and CV risk, there are four major confounding factors: age,¹² smoking habit,³⁰ CRP levels, NSAIDs intake, and disease duration. These variables directly influence both structural damage and CV risk. Therefore, when assessing the relationship between structural damage and CV risk, these variables should be taken into account, as we have done in our study, finding an independent association between total mSASSS and SCORE, and between total mSASSS and atherosclerotic plaques. Besides, mSASSS might be considered as a marker of the previous inflammatory burden, apart from the CRP levels from the beginning of the disease (and not only in the most recent 5 years) that would also explain the association with CV risk.

Regarding the potential role of NSAIDs in atherosclerosis, the metabolism of arachidonic acid is implicated in the pathophysiology of CV ischemic diseases, and special attention has been paid to the pathway catalyzed by cyclooxygenase, which leads to the production of prostanoids. NSAIDs are first line treatment in axSpA, and use of COX-2 inhibitors (COXIBS) has revealed an increase in the incidence of CV events, especially myocardial infarction, since the balance between proinflammatory and anti-inflammatory prostaglandins isomerases seems to be an important determinant of the role of COX-2 in plaque stability.⁵²

Even though r-axSpA patients with greater structural damage, and, as a consequence, higher mSASSS may be those who take more NSAIDs and therefore they could show a higher CV risk and experience more CV events, some studies performed in patients with inflammatory rheumatic diseases have found that the long-term use of some anti-inflammatory drugs could help to decrease the CV risk related to the persistent inflammation situation in these patients. In addition, COXIBS were not associated with an increased risk for vascular mortality. Several studies in patients with RA have showed a reduction in vascular mortality with NSAID use.⁵³ Several anti-inflammatory treatments have been proposed as potential therapeutic strategies for atherosclerosis by reducing the overall vascular risk imposed by inflammation. Furthermore, treatment of the underlying inflammatory process could contribute to improving CV risk in patients with inflammatory rheumatic diseases.⁵⁴ Actually, in this study, we present results of patients with absence of CV events even though most of them were taking NSAIDs permanently. Currently, answering how treatment with NSAIDs affects the CV risk in patients with rheumatic inflammatory diseases, in particular r-axSpA, and if these should be treated with NSAIDs continuously or intermittently from a CV point of view is a significant requirement.⁸ In SpA, the impact of anti-inflammatory treatments on CV events or mortality has been assessed only rarely.⁵⁵

Among the limitations of this study, the cross-sectional design does not allow us to find a causal relationship between structural damage and CV risk. Actually, the association between the mSASSS and CV risk has been identified using a surrogate variable, the SCORE index. However, in this analysis, we did not evaluate CV events

since we excluded patients with such occurrences. To better understand the association of structural damage with CV risk assessed in terms of CV events, and the underlying mechanisms involving the association between radiographic structural damage in the spine and sacroiliac joints, the increased CV risk and persistent inflammation, and the influence of treatments, longitudinal studies with prospective follow up are required.

Despite the limitations, the strengths of this study include that all the analyses were adjusted for age and a large number of patients were included. Moreover, the association between CV risk and structural damage has been adjusted for age, tobacco, inflammation, and disease duration, which are confounding factors biologically associated with both SCORE and mSASSS.

In summary, for the first time, our results support the association of structural damage and predicted CV risk in patients with axSpA independently of age, tobacco, inflammation, and disease duration. Further prospective studies are needed in order to better elucidate this relationship between CV risk and structural damage.

Acknowledgements

The authors would like to thank all of the patients who participated in the study. In memory of María del Carmen Castro-Villegas, co-author of this article, for her deep dedication to the spondyloarthropathies, your loss leaves an enormous sadness in our hearts.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: CL-P was supported by a contract from the Spanish Junta de Andalucía (“Nicolás Monardes” program). This work was supported by a grant from the ‘Junta de Andalucía’ (PI-0139-2017).


Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.


ORCID iDs

María Lourdes Ladehesa-Pineda  <https://orcid.org/0000-0002-3890-2224>

Clementina López-Medina  <https://orcid.org/0000-0002-2309-5837>

Rafaela Ortega-Castro  <https://orcid.org/0000-0002-7552-3469>

Ignacio García-Gómez  <https://orcid.org/0000-0002-4607-5644>

Yolanda Jiménez-Gómez  <https://orcid.org/0000-0002-1607-2717>

Nuria Barbarroja  <https://orcid.org/0000-0002-0962-6072>

References


1. Dougados M and Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet* 2011; 377: 2127–2137.
2. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, *et al.* The development of assessment of spondyloarthritis international society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 777–783.
3. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, *et al.* The assessment of spondyloarthritis international society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 25–31.
4. López-Medina C and Moltó A. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheum* 2018; 32: 241–253.
5. Moltó A, Etcheto D, van der Heijde R, *et al.* Prevalence of comorbidities and evaluation of their screening in spondyloarthritis: results of the international cross-sectional ASAS-COMOSPA study. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1016–1023.
6. Moltó A and Dougados M. Comorbidities in spondyloarthritis including psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018; 32: 390–400.
7. Castañeda S, Nurmohamed MT and González-Gay MA. Cardiovascular disease in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2016; 30: 851–869.
8. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, *et al.* EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 17–28.
9. Papagoras C, Voulgari PV and Drosos AA. Cardiovascular disease in spondyloarthritis. *Curr Vasc Pharmacol* 2020; 18: 473–487.

10. López-Medina C, Jiménez-Gómez Y, Moltó A, *et al.* Cardiovascular risk factors in patients with spondyloarthritis from Northern European and Mediterranean countries: an ancillary study of the ASASCOMOSPA project. *Joint Bone Spine* 2018; 85: 447–453.
11. Liew JW, Ramiro S and Gensler LS. Cardiovascular morbidity and mortality in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018; 32: 369–389.
12. Ramiro S, Stolwijk C, van Tubergen A, *et al.* Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 52–59.
13. Ward MM, Leach TJ, Gensler LS, *et al.* Regional radiographic damage and functional limitations in patients with ankylosing spondylitis: differences in early and late disease. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65: 257–265.
14. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, *et al.* Progression of radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis: defining the central role of syndesmophytes. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 910–915.
15. Aouad K, Ziade N and Baraliakos X. Structural progression in axial spondyloarthritis. *Joint Bone Spine* 2020; 87: 131–136.
16. Almodóvar R, Ríos V, Ocaña S, *et al.* Association of biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover with gender, disease activity, radiological damage, and sacroiliitis by magnetic resonance imaging in patients with early spondyloarthritis. *Clin Rheumatol* 2014; 33: 237–241.
17. Braun J, Baraliakos X, Hermann K-GA, *et al.* Serum C-reactive protein levels demonstrate predictive value for radiographic and magnetic resonance imaging outcomes in patients with active ankylosing spondylitis treated with golimumab. *J Rheumatol* 2016; 43: 1704–1712.
18. Li ZH, Zhong WF, Lv YB, *et al.* Associations of plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations with all-cause and cause-specific mortality among middle-aged and elderly individuals. *Immun Ageing* 2019; 16: 28.
19. Ridker PM. A test in context: high-sensitivity C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol* 2016; 67: 712–723.
20. The Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Kaptoge S, *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 132–140.
21. Wang K, Wang Y, Chu C, *et al.* Joint association of serum homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein with arterial stiffness in Chinese population: a 12-year longitudinal study. *Cardiology* 2019; 144: 27–35.
22. Blaum C, Brunner FJ, Kröger F, *et al.* Modifiable lifestyle risk factors and C-reactive protein in patients with coronary artery disease: implications for an anti-inflammatory treatment target population. *Eur J Prev Cardiol* 2019; 10: 2047487319885458.
23. Costantino S, Paneni F and Cosentino F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J Physiol* 2016; 594: 2061–2073.
24. van der Heijde D, Braun J, Deodhar A, *et al.* Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2019; 58: 388–400.
25. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, *et al.* 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the sixth joint task force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Atherosclerosis* 2016; 252: 207–274.
26. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, *et al.* Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987–1003.
27. O’Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, *et al.*; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med* 1999; 340: 14–22.
28. Van der Heijde D, Braun J, Deodhar A, *et al.* Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2019; 58: 388–400.
29. Liew JW, Ramiro S and Gensler LS. Cardiovascular morbidity and mortality in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018; 32: 369–389.
30. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, *et al.* Cigarette smoking has a dose-dependent impact on progression of structural damage in the spine in patients with axial spondyloarthritis: results from the German SPondyloarthritis Inception Cohort (GESPIC). *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1430–1432.

31. Glintborg B, Højgaard P, Lund Hetland M, *et al.* Impact of tobacco smoking on response to tumor necrosis factor- α inhibitor treatment in patients with ankylosing spondylitis: results from the Danish nationwide DANBIO registry. *Rheumatology* 2016; 55: 659–668.
32. Moltó A, Etcheto A, van der Heijde D, *et al.* Prevalence of comorbidities and evaluation of their screening in spondyloarthritis: results of the international cross-sectional ASAS-COMOSPA study. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1016–1023.
33. Bakirci S, Dabague J, Eder L, *et al.* The role of obesity on inflammation and damage in spondyloarthritis: a systematic literature review on body mass index and imaging. *Clin Exp Rheumatol* 2020; 38: 144–148.
34. Atzeni F, Nucera V, Galloway J, *et al.* Cardiovascular risk in ankylosing spondylitis and the effect of anti-TNF drugs: a narrative review. *Expert Opin Biol Ther* 2020; 20: 517–524.
35. Solomon DH, Love TJ, Canning C, *et al.* The risk of diabetes among patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 2114–2117.
36. López-Medina C, Jiménez-Gómez Y, Moltó A, *et al.* Cardiovascular risk factors in patients with spondyloarthritis from Northern European and Mediterranean countries: an ancillary study of the ASAS-COMOSPA project. *Joint Bone Spine* 2018; 85: 447–453.
37. Papagoras C, Markatseli TE, Saougou I, *et al.* Cardiovascular risk profile in patients with spondyloarthritis. *Joint Bone Spine* 2014; 81: 57–63.
38. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD, *et al.* Systemic inflammatory response and atherosclerosis: the paradigm of chronic inflammatory rheumatic diseases. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 1890.
39. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, *et al.* 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the sixth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European association for cardiovascular prevention & rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis* 2016; 252: 207–274.
40. Colaco K, Ocampo V, Ayala AP, *et al.* Predictive utility of cardiovascular risk prediction algorithms in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *J Rheumatol*. Epub ahead of print 15 August 2019. DOI: 10.3899/jrheum.190261.
41. Kang KY, Her YH, Ju JH, *et al.* Radiographic progression is associated with increased cardiovascular risk in patients with axial spondyloarthritis. *Mod Rheumatol* 2016; 26: 601–606.
42. Rueda-Gotor J, Llorca J, Corrales A, *et al.* Carotid ultrasound in the cardiovascular risk stratification of patients with ankylosing spondylitis: results of a population-based study. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34: 885–892.
43. Rueda-Gotor J, Quevedo-Abeledo JC, Corrales A, *et al.* Reclassification into very-high cardiovascular risk after carotid ultrasound in patients with axial spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2020; 38: 724–731.
44. Rueda-Gotor J, Llorca J, Corrales A, *et al.* Cardiovascular risk stratification in axial spondyloarthritis: carotid ultrasound is more sensitive than coronary artery calcification score to detect high-cardiovascular risk axial spondyloarthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36: 73–80.
45. Eriksson JK, Jacobsson L, Bengtsson K, *et al.* Is ankylosing spondylitis a risk factor for cardiovascular disease, and how do these risks compare with those in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 364–370.
46. Gabriel SE and Crowson CS. Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24: 171–176.
47. Solomon DH, Kremer J, Curtis JR, *et al.* Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1920–1925.
48. Kozera L, Andrews J and Morgan AW. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis—the next step: differentiating true soluble biomarkers of cardiovascular risk from surrogate measures of inflammation. *Rheumatology* 2011; 50: 1944–1954.
49. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, *et al.* Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1388–1398.
50. Kang KY, Kwok SK, Ju JH, *et al.* The predictors of development of new syndesmophytes in female patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2015; 44: 125–128.
51. Ramiro S, van der Heijde D, van Tubergen A, *et al.* Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing

- spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1455–1461.
52. Cipollone F and Fazio ML. COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 26–36.
53. Haroon NN, Paterson JM, Li P, *et al.* Patients with ankylosing spondylitis have increased cardiovascular and cerebrovascular mortality: a population-based study. *Ann Intern Med* 2015; 163: 409–416.
54. Roubille C, Richer V, Starnino T, *et al.* The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 480–489.
55. Prati C, Demougeot C, Guillot X, *et al.* Vascular involvement in axial spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* 2019; 86: 159–163.

Visit SAGE journals online
[journals.sagepub.com/
home/tab](http://journals.sagepub.com/home/tab)

 SAGE journals



Sociedad Española
de Reumatología
Colegio Mexicano
de Reumatología

Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



PÓSTERES EXHIBIDOS

XLV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología

Valencia, 21-24 de mayo de 2019

1.ª sesión

Miércoles, 22 de mayo

P001. FILGOTINIB, UN INHIBIDOR SELECTIVO DE LA JAK 1, ES EFECTIVO EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE ACTIVA QUE PRESENTAN UNA RESPUESTA INADECUADA A LOS AINE: RESULTADOS DE UN ESTUDIO DE FASE 2 ALEATORIZADO Y CONTROLADO POR PLACEBO

A. Mera Varela¹, D. van der Heijde², X. Baraliakos³, L.S. Gensler⁴, W.P. Maksymowych⁵, V. Tseluyko⁶, O. Nadashkevich⁷, W. Abi-Saab⁸, Ch. Tasset⁹, L. Meuleners⁹, R. Besuyen⁹, T. Hendrikx⁹, N. Mozaffarian¹⁰, K. Liu¹⁰, J.M. Greer¹⁰, A. Deodhar¹¹ y R. Landewé¹²

¹Servicio de Reumatología. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, IDIS. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, CHUS. SERGAS ²Departamento de Reumatología. Centro Médico Universitario de Leiden. Leiden. Países Bajos. ³Rheumazentrum Ruhrgebiet. Ruhr-University Bochum. Herne. Alemania. ⁴División de Reumatología. Universidad de California. San Francisco. CA. EE. UU. ⁵Departamento de Medicina. Universidad de Alberta. Edmonton. Alberta. Canadá. ⁶Departamento de Reumatología. Academia de Posgrado de Medicina de Kharkiv. Kharkiv. Ucrania. ⁷Universidad Nacional de Medicina de Lviv. Lviv. Ucrania. ⁸Galapagos NV. Mechelen. Bélgica. ⁹Galapagos BV. Leiden. Países Bajos. ¹⁰Gilead Sciences. Foster City. CA. EE. UU. ¹¹División de Artritis y Enfermedades Reumáticas. Universidad de Ciencia y Salud de Oregón. Portland. OR. EE. UU. ¹²Departamento de Reumatología e Inmunología Clínica. Centro Médico Universitario de Ámsterdam. Ámsterdam. Países Bajos. Departamento de Reumatología. Hospital Zuyderland. Heerlen. Países Bajos.

Introducción y objetivos: Filgotinib (FIL) es un inhibidor selectivo de la Janus cinasa (JAK) 1, de administración oral. Se evaluó la seguridad y la eficacia de FIL en pacientes adultos con espondilitis anquilosante (EA) activa.

Métodos: Estudio de fase 2, multicéntrico, aleatorizado, dobleciego, controlado por placebo (PBO), de 12 semanas de duración. Los pacientes presentaban EA activa (criterios de Nueva York modificados), índice de actividad de Bath (BASDAI) de ≥ 4 con dolor en la columna vertebral ≥ 4 y nivel de PCR de alta sensibilidad ≥ 3 mg/l, a pesar de la administración previa de ≥ 2 fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los pacientes podían presentar hasta una exposición previa a fármacos anti-TNF y podían continuar con AINE/inhibidor de ciclooxigenasa-2 y 1 fármaco antirreumático modificador de la enfermedad sintético convencional. Los

pacientes se aleatorizaron 1:1 a FIL 200 mg o PBO una vez al día. El objetivo primario fue la variación de la actividad de la enfermedad medido por el índice ASDAS en la semana 12 con relación al inicio del estudio. Los objetivos secundarios de evaluación incluyeron la proporción de pacientes que lograron una mejoría clínicamente importante o mejoría mayor (disminuciones desde el inicio del estudio de $\geq 1,1$ y ≥ 2 , respectivamente), ASAS 20/40/ y 5/6, remisión parcial conforme a los criterios de mejoría de la Sociedad Internacional de Espondiloartritis (ASAS), y el cambio desde el estado basal en las puntuaciones SPARCC (Spondyloarthritis Research Consortium of Canadá) por medio de resonancia magnética (MRI) de las articulaciones sacroilíacas (ASI) y la columna vertebral.

Tabla 1. Resultados principales y secundarios de eficacia en la semana 12

Todos los pacientes aleatorizados y expuestos	FIL 200 mg QD n = 58	PBO n = 58	Valor p
Los valores se expresan con relación al inicio del estudio, salvo que se indique otra cosa			
ASDAS ^a	-1,5 (1,04)	-0,6 (0,82)	< 0,0001
ASDAS MCS ^b , %	66	26	< 0,0001
ASDAS MI ^b , %	33	1,7	< 0,0001
ASAS20 ^c , %	76	40	< 0,0001
ASAS40 ^c , %	38	19	0,0189
ASAS5/6 ^c , %	59	21	< 0,0001
ASAS RP ^d , %	12	3,4	0,1028
BASDAI ^e	-2,4 (2,01)	-1,4 (2,02)	0,0052
BASFI ^f	-2,45 (1,90)	-1,2 (1,88)	0,0015
BASMI (lineal) ^g	-0,8 (1,02)	-0,4 (0,70)	0,0093
ASQoL ^h	-4,8 (4,50)	-2,2 (3,97)	0,0038
SF-36, MCS ⁱ	4,0 (7,05)	1,0 (9,83)	0,0703
SF-36, PCS ⁱ	8,4 (8,18)	3,8 (7,10)	0,0008
hsCRP ^j	-10,8 (13,91)	-2,2 (17,35)	0,0001
	n = 48	n = 42	
SPARCC ASI RMc	-3,5 (7,31)	0,06 (3,51)	0,0150
	n = 47	n = 42	
SPARCC columna RMc	-5,8 (11,13)	0,5 (7,47)	0,0066

aLOCf: imputación de la última observación realizada; bNRI: imputación de pacientes sin respuesta; cCO: casos observados.

ASAS: evaluación de la Sociedad Internacional de Espondiloartritis; ASDAS: puntuación de la actividad de la enfermedad de espondilitis anquilosante; ASQoL: cuestionario de calidad de vida de la espondilitis anquilosante; BASDAI: índice de actividad de Bath de la enfermedad de espondilitis anquilosante; BASFI: índice funcional de Bath de la espondilitis anquilosante; BASMI: índice de metrología de Bath de la espondilitis anquilosante; CVI: cambio respecto a los valores iniciales; MCS: mejoría clínicamente significativa; FIL: filgotinib; hsCRP: proteína C reactiva de alta sensibilidad; MCS: resumen del componente mental; MI: mejoría importante; PBO: placebo; PCS: resumen del componente físico; RP: remisión parcial; ASI: articulación sacroilíaca; SF-36: cuestionario de salud, formato breve; SPARCC: Consorcio de Investigación de la Espondiloartritis de Canadá.

Resultados: 107 pacientes completaron el estudio (n = 52 PBO, n = 55 FIL). Las características al inicio del estudio eran similares en los dos grupos (medias generales [DE]): 42 años (10,3), 74%, varones, 7 años desde el momento del diagnóstico (6,7), ASDAS 4,2 (0,70), SPARCC por RM en la ASI de 6,1 (9,17) y en la columna, 16,5 (19,9). Para FIL y PBO, el cambio medio de la puntuación ASDAS en la semana 12 fue de -1,5 y -0,6; el 76% y el 40% lograron una puntuación ASAS20; y el 38% y el 19% lograron una puntuación ASAS40, respectivamente. El cambio respecto al inicio del estudio en la puntuación SPARCC determinada mediante RM en la ASI en la semana 12 fue de -3,5 y 0,06 y en la columna vertebral fue de -5,8 y 0,5, respectivamente. La incidencia de acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (AAST) (FIL, 31,0%; PBO, 31,0%), infecciones (FIL, 12,1%; PBO, 12,1%) y discontinuación debido a AAST (FIL, 1,7%; PBO, 1,7%) fueron similares entre grupos. Se produjo 1 AAST grave de neumonía (FIL), el único AAST que condujo a la interrupción definitiva del fármaco en el estudio. No se produjeron muertes, neoplasias malignas ni infecciones oportunistas. Hubo un caso de trombosis venosa profunda (FIL) en un paciente con una mutación heterocigótica para factor V Leyden. Los resultados del laboratorio en el grupo de FIL mostraban aumento de la hemoglobina (+5 g/l), disminución de las plaquetas (-23 Giga/l), recuentos de células *natural killer* estables, y aumento del colesterol total (+0,39 mmol/l), que produjo un descenso del 11% en la ratio LDL/HDL en la semana 12 con relación al inicio del estudio.

Conclusiones: FIL mostró una eficacia superior respecto al PBO en pacientes con EA activa, en los objetivos principales y secundarios. No se identificaron nuevos datos sobre seguridad.

P002. RELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS ECOGRÁFICOS Y PARÁMETROS CLÍNICOS, ACTIVIDAD Y DAÑO ESTRUCTURAL EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS

I.C. Aranda Valera¹, L. Ladehesa Pineda, I. Gómez García¹, M.C. Castro Villegas¹, M.C. Ábalos Aguilera¹, L. Bautista Aguilar¹, R. Segura Ruiz¹, R. Ortega Castro¹, C. López Medina^{1,2}, L. Pérez Sánchez¹, M.A. Puche Larrubia¹, J.L. Garrido Castro¹, P. Font Ugalde¹, Y. Jiménez Gómez¹ y E. Collantes Estévez¹

¹Servicio de Reumatología. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica, IMIBIC. Universidad de Córdoba. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España. ²Hôpital Cochin. París. Francia.

Introducción: La entesitis es una manifestación clave en la expresión clínica de las espondiloartritis (EspA), pero la exploración física de las entesis carece de sensibilidad, precisión y fiabilidad. Por esta razón, se hace necesario utilizar pruebas de imagen que aumenten su precisión y la detecten. En este sentido la ecografía ha demostrado fiabilidad, validez, y, más recientemente, sensibilidad al cambio, aunque aún no hay muchos estudios que relacionen los índices ecográficos con el resto de los parámetros clínicos.

Objetivos: Evaluar la asociación entre entesitis ecográfica en los pacientes con EspA y la actividad clínica y radiográfica.

Métodos: Estudio transversal descriptivo que incluye 70 pacientes con EspA de la cohorte COSPAR del Hospital Universitario Reina Sofía. El sistema de puntuación del índice de entesis sonografía de Madrid (MASEI) se utilizó para cuantificar el grado de anomalías entésicas ecográficas. Se evaluó la asociación entre MASEI y parámetros clínicos (tiempo de evolución y presencia de HLA-B27),

de actividad (ASDAS, PCR y VSG), daño estructural (mSSAS), índices metrológicos (BASMI), cuestionarios de actividad (BASDAI) y función (BASFI), así como con índices de análisis de movimiento (UCOASMI). Para el análisis estadístico se realizó el test ji-cuadrado y correlaciones bivariadas mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 43 ± 12 años, 46 eran hombres (66,7%), 60 pacientes presentaban afectación axial, 4 pacientes tenían afectación periférica y 6 sujetos presentaban afectación mixta. En la tabla 1 se recogen los hallazgos ecográficos en modo B (escala de grises) del grupo completo de pacientes: bursitis, entesofitos, pérdida de la ecoestructura fibrilar normal, pérdida de ecogenicidad, edema de tejido celular subcutáneo, engrosamiento en la entesis, erosiones óseas, así como la presencia de señal Doppler según su distribución anatómica. Del total de pacientes, 24 (34,4%) presentaban un índice de MASEI patológico (puntuación > 18). En la tabla 2 se expresan los resultados de las correlaciones del índice de MASEI de los pacientes que presentaban lesiones de actividad (Doppler + y/o Bursa > 2 mm) (N = 57) siendo estadísticamente significativa su correlación con el tiempo de evolución (p = 0,033), mSSASS (p = 0,005), BASMI (p = 0,043) y UCOASMI (p = 0,019).

Conclusiones: en nuestra cohorte el índice MASEI correlaciona con el tiempo de evolución, el mSSASS, BASMI y UCOASMI, no pudiendo demostrar asociación con los parámetros de actividad clínica.

Tabla 1. Anomalías entésicas ecográficas en el grupo completo de pacientes

Región anatómica explorada	Calcificación N (%)	Estructura N (%)	Grosor N (%)	Erosión N (%)	Bursa N (%)	Doppler N (%)
Fascias	18 (25)	23 (32,9)	24 (34,4)	1 (1,4)	-	-
T. aquileos	42 (60)	26 (37)	26 (37)	8 (11,4)	34 (49,3)	3 (4,3)
Rotulianos distales	35 (50)	16 (22,9)	14 (20)	20 (28,6)	50 (71,4)	3 (4,3)
Rotulianos proximales	14 (20)	12 (17,1)	11 (15,7)	1 (1,4)	-	-
Cuádriceps	42 (60)	15 (21,4)	11 (15,7)	1 (1,4)	-	-
Tríceps	33 (47,1)	12 (17,1)	10 (14,3)	6 (8,6)	-	1 (1,4)

P003. INFILIXIMAB TROUGH LEVELS AND DISEASE ACTIVITY PREDICT EARLY CLINICAL RESPONSE IN PATIENTS WITH AXIAL SPONDYLOARTRITIS

A. Martínez-Feito^{1,2}, C. Plasencia-Rodríguez^{2,3}, B. Hernández-Breijo², V. Navarro-Compán^{2,3}, E. Olariaga Mérida², D. Peiteado^{2,3}, A. Villalba^{2,3}, L. Nuño^{2,3}, I. Monjo^{2,3}, C. Diego¹, D. Pascual-Salcedo² and A. Balsa^{2,3}

¹Immunology Unit. La Paz University Hospital. ²Immuno-Rheumatology Research Group. Institute for Health Research, IdiPAZ. Madrid. Spain.

³Rheumatology Department. La Paz University Hospital.

Introduction: Infliximab (Ifx) has proven to be effective in patients with axial spondyloarthritis (axSpA). Several variables may affect pharmacokinetic-pharmacodynamic of Ifx and its relation with clinical response, such as: disease activity, the development of anti-drug antibodies (ADA) and the concomitant use of conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs. The improvement of patient's management by achieving optimal serum drug concentration associated with good clinical response is the main goal of therapeutic drug monitoring which can be helpful in the prediction of clinical response to biological treatment.

Tabla P002

Tabla 2. Correlaciones del índice de MASEI de los pacientes que presentaban lesiones de actividad

	B27	T. evol	ASDAS	PCR	VSG	mSSASS	UCOASMI	BASMI	BASDAI	BASFI
p	0,475	0,033	0,950	0,981	0,608	0,005	0,019	0,043	0,798	0,693

Objectives: To identify clinical and serological variables at early stages of treatment that can predict clinical response in patients with axSpA treated with Ifx.

Methods: Observational study including 81 patients with axSpA treated with Ifx and monitored during 24 weeks (W). The study was approved by the Medical Ethics Committee (PI no. 1,155). Serum Ifx levels and ADA were measured by capture ELISA and by bridging ELISA respectively at baseline, W2, W6, W14 and W24. Disease activity was assessed at baseline and W24 by the Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) and clinical response was defined by #t ASDAS \geq 1.1 (clinically important improvement). The association between clinical response at W24 and clinical and serological variables was evaluated by univariable and multivariable logistic regression analyses. Serum Ifx levels at W2, 6 and 14 as a categorical variable (above or under the corresponding median value of levels at each time week), age, sex, HLA-B27, methotrexate (MTX), sulfasalazine, body mass index, smoke status, prednisone, C-reactive protein and ASDAS at baseline were included as independent variables. Receiver operating characteristic (ROC) curves for the outcome of clinical response after 24 weeks of treatment were employed to determine the best cut-off values for the predictors (serum Ifx concentrations and baseline ASDAS). Ifx survival was evaluated through Kaplan-Meier curves.

Results: In the univariable analyses, higher serum Ifx trough levels at W14 (OR: 3.9; 95% CI: 1.5-10.4); higher baseline ASDAS (OR: 1.9; 95% CI: 1.1-3.1) and MTX use (OR: 3.3; 95% CI 1.2-8.7) were associated with a better clinical response at W24. Patients with concomitant MTX had higher serum Ifx trough levels (median and IQR) than patients without MTX and these differences were significant at W6: 26.37(16-41.4) versus 16.9 (11.4-26.9); $p = 0.008$; at W14: 8.4 (5.4-13.9) versus 4.1 (1.8-7.8); $p = 0.003$ and at W22: 5.1 (2.2-8.3) versus 3.1 (0.6-5.4); $p = 0.006$, respectively). In the multivariable analysis, higher ASDAS at baseline (OR: 1.8; CI 95%: 1.1-3.0) and higher serum Ifx trough levels at W14 (OR: 3.6; CI 95%: 1.3-10.4) remained significantly associated. Serum Ifx concentration at W14 \geq 6.7 $\mu\text{g/ml}$ and a disease activity score at baseline \geq 3.5 were found to be associated with higher #t ASDAS at W24 (OR: 16; 95% CI: 3.6-71.7) No patient with Ifx levels at W14 \geq 6.7 $\mu\text{g/ml}$ developed ADA during the 24 weeks follow up. The combination of both variables was used to predict clinical response with a sensitivity of 87.5%, specificity of 69.6%, PPV of 75% and NPV of 84.2%.

Conclusions: Elevated baseline ASDAS and high serum Ifx trough levels at W14 are associated with better clinical response at 24 weeks in patients with axSpA under Ifx therapy. A predictive model based on these variables is suggested to identify early responders to Ifx treatment.

P004. ASOCIACIÓN ENTRE LA PROGRESIÓN RADIOGRÁFICA Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS: DATOS DEL REGISTRO COSPAR

M.L. Ladehesa Pineda^{1,2,3}, I. Gómez García^{1,2,3}, M.C. Castro Villegas^{1,2,3}, P. Seguí Azpilcueta⁴, M.C. Ábalos Aguilera², L. Bautista Aguilar³, I.C. Aranda Valera^{1,2,3}, R. Segura Ruiz^{1,3}, R. Ortega Castro^{1,2,3}, C. López Medina^{3,5}, L. Pérez Sánchez^{1,2,3}, M.A. Puche Larrubia¹, J.L. Garrido Castro³, R. López Pedrera², A. Escudero Contreras^{1,2,3}, E. Collantes Estévez^{1,2,3} y. Jiménez Gómez²

¹UGC de Reumatología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

²Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, IMIBIC.

³Universidad de Córdoba. ⁴UGC de Radiología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ⁵Hôpital Cochin. París.

Introducción: Se ha sugerido que la progresión radiográfica se asocia con el aumento del riesgo cardiovascular (CV) en pacientes con espondiloartritis axial (EspAax)¹. No obstante, la relación entre las

características de la enfermedad directamente relacionadas con el daño estructural y el aumentado riesgo CV aún no ha sido completamente definida.

Objetivos: Analizar la asociación del riesgo CV y la presencia de placas de ateroma carotídeas con el daño estructural radiográfico en una cohorte de pacientes con EspA.

Métodos: 85 pacientes con EspAax del registro de EspA de Córdoba (CoSpAR) fueron seleccionados para este estudio transversal. A todos los pacientes, reclutados de forma probabilística y secuencial de una consulta monográfica de EspA en la UGC de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, se les realizó historia clínica completa, examen físico y bioquímico. Se recogieron variables demográficas, clínicas: tipo de EspA, tiempo de evolución, estatus del HLA-B27, afectación radiográfica (radiografía simple), daño estructural (índice mSASSS), actividad de la enfermedad (VSG, PCR, índice BASDAI e índice ASDASpcr) y factores de riesgo CV. El riesgo CV se determinó por el índice SCORE y la presencia de placas carotídeas por ecografía Doppler de troncos supraaórticos realizada por un radiólogo experto. Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS v25. Para comparar las características radiológicas en función de la presencia de placas de ateroma se realizó la prueba “t” de Student para datos independientes. Para encontrar factores predictores del aumento del riesgo CV medido por el índice SCORE se utilizó una regresión lineal múltiple (RLM). Todos los contrastes realizados tanto en el estudio univariante como múltiple fueron bilaterales.

Resultados: Las características basales demográficas y clínicas de los pacientes con EspAax se presentan en la tabla 1, y las características relacionadas con el daño estructural y el riesgo CV en la tabla 2. Las variables cuantitativas se describen como media (desviación típica), las cualitativas como número de casos (porcentaje del total). Al analizar las placas de ateroma en la bifurcación carotídea se observó que la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad y las variables relacionadas con el daño radiográfico (mSASSS total, mSASSS cervical, mSASSS lumbar y puentes óseos) eran significativamente mayores en los pacientes con presencia de placas de ateroma ($p < 0,05$). Además, se halló que el mSASSS cervical ($p = 0,063$) y la edad ($p < 0,0001$) presentaban asociación con el índice SCORE para predecir el aumento del riesgo CV en el análisis de RLM.

Conclusiones: 1) La presencia de placas de ateroma en pacientes con EspAax se asocia no solo con la edad y el tiempo de evolución, sino también con el grado de afectación radiográfica. 2) La edad y el daño estructural cervical pueden predecir el aumento de riesgo CV observado en EspAax. Hemos encontrado un aumento del riesgo CV en pacientes con EspAax con mayor edad y afectación radiográfica, sobre todo a nivel cervical, por lo que sería importante identificar a estos pacientes para realizar un control más estrecho y evitar el desarrollo de complicaciones CV.

Subvencionado por: JA PI-0139-2017.

Tabla 1

Edad (años) (N = 85)	44,55 \pm 12,22
Sexo (varones) (N = 85)	59 (69,4)
HLA B27 (N = 83)	71 (83,5)
Espondiloartritis axial (N = 85)	79 (92,9)
Afectación axial radiográfica (N = 77)	63 (74,1)
Psoriasis (N = 84)	10 (11,8)
IMC (kg/m ²) (N = 80)	26,88 \pm 4,13
Tiempo de evolución (años) (N = 82)	18,01 \pm 13,62
Fumador (N = 84)	33 (38,8)
ASDAS-PCR	3,13 \pm 1,05
ASAS HI (N = 82)	4,05 \pm 3,8
BASDAI (N = 84)	3,48 \pm 2,17
PCR (mg/l) (N = 80)	6,64 \pm 10,86
VSG (mm/h) (N = 63)	8,49 \pm 9,22
Hipertensión arterial	16 (18,8)
Diagnóstico hiperlipemia (N = 83)	13 (15,3)
Antecedente familiar de enfermedad CV (N = 84)	38 (44,7)

Tabla 2

mSASSS total (N = 79)	14,84 ± 18,4
mSASSS cervical (N = 79)	7,27 ± 9,64
mSASSS lumbar (N = 79)	7,72 ± 10,14
TAS (mmHg) (N = 82)	125,43 ± 20,12
TAD (mmHg) (N = 82)	80,72 ± 11,7
Glucosa (mg/dl) (N = 80)	84,02 ± 14,5
Colesterol total (mg/dl) (N = 80)	187,84 ± 33,75
HDL (mg/dl) (N = 79)	54,92 ± 15,54
LDL (mg/dl) (N = 78)	111,96 ± 30,91
Triglicéridos (mg/dl) (N = 80)	100,68 ± 65,85
Insulina (mg/dl) (N = 70)	6,1 ± 4,1
Tratamiento hipolipemiente (N = 84)	8 (9,4)
Diabetes mellitus (N = 84)	1 (1,2)
Placa de ateroma en bifurcación (N = 66)	14 (16,5)
Resistencia a la Insulina (N = 85)	7 (3,4)
SCORE (N = 78)	
Riesgo CV bajo	60 (76,9)
Riesgo CV moderado	10 (12,8)
Riesgo CV alto	4 (5,1)
Riesgo CV muy alto	4 (5,1)

Bibliografía

Kang KY, Her YH, Ju JH, et al. *Mod Rheumatol*. 2016;26:601-6.

P005. ESPONDILOARTRITIS AXIAL: RECOMENDACIONES PARA EL USO DE HERRAMIENTAS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD Y DESARROLLO DE UNA DEFINICIÓN DE CONSENSO PARA LA REMISIÓN

X. Juanola Roura¹, E. Collantes-Estévez², C. Fernández-Carballido³, J. Gratacós⁴ y P. Zarco⁵

¹Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL. Barcelona. ²Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ³Hospital Universitario San Juan de Alicante. Alicante. ⁴Hospital de Sabadell. Corporació Universitaria Parc Taulí. Barcelona. ⁵Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Madrid.

Introducción: Se han propuesto varias definiciones de remisión en la espondiloartritis axial (EspAax) basadas en las herramientas de valoración de la actividad de la enfermedad disponibles, pero hasta la fecha no existe una definición universalmente aceptada para el desarrollo de ensayos clínicos o la práctica clínica habitual.

Objetivo: Establecer recomendaciones respecto a la valoración de la actividad de la enfermedad y desarrollar una propuesta de definición de remisión clínica en EspAax, basada en la revisión de la mejor evidencia disponible y el consenso de un grupo de expertos en esta patología.

Métodos: Se utilizó una metodología Delphi modificada. Un comité científico formado por 5 expertos redactó 80 ítems que se enviaron en 2 rondas (en septiembre y octubre de 2018, respectivamente) a un panel de 152 reumatólogos con amplia experiencia en el abordaje de pacientes con EspAax y la gran mayoría miembros del Grupo para el Estudio de la Espondiloartritis de la Sociedad Española de Reumatología (GRESSER). Estos ítems abordaban temas controvertidos relacionados con la evaluación actual de la remisión, características clínicas, resultados de laboratorio y de pruebas de imagen, y si deberían incluirse en la definición de remisión en opinión de los panelistas recomendaciones generales para el seguimiento y el uso de escalas de valoración de actividad de la enfermedad.

Resultados: Se llegó a un acuerdo para 56 de los 80 ítems propuestos (70%). Los panelistas concluyeron que, aunque actualmente no se dispone de una definición de remisión en EspAax, existe consenso en que es posible lograr la remisión en este trastorno. Hubo acuerdo en que la definición de remisión en EspAax debe incluir: dolor, fatiga, limitación funcional, movilidad, manifestaciones extrarticulares, manifestaciones periféricas, inflamación articular, actividad de la enfermedad, pruebas de laboratorio, calidad de vida, necesidad de tratamiento, progresión radiográfica de la enfermedad y las valoraciones globales del médico y del paciente.

Se recomienda establecer un objetivo terapéutico cuando se inicia el tratamiento en pacientes con EspAax, siendo el objetivo ideal la remisión, pero la baja actividad de la enfermedad también puede ser aceptable como objetivo alternativo. La herramienta preferida para la valoración de la actividad de la enfermedad durante el seguimiento en consultas es el ASDAS, que tiene como puntos de corte < 1,3 para remisión y de ≥ 1,3 a < 2,1 para baja actividad de la enfermedad. La propuesta de definición de remisión clínica en EspAax consensuada incluye la remisión definida por ASDAS asociada con la ausencia de actividad extrarticular (psoriasis, uveítis, enfermedad inflamatoria intestinal) y periférica (artritis, entesitis, dactilitis), la ausencia de actividad evaluada mediante la normalización de los niveles de PCR y la ausencia de evidencia de progresión radiográfica.

Conclusiones: A partir de la revisión de la evidencia disponible y el consenso del panel de expertos se han podido desarrollar recomendaciones sobre el uso de las herramientas de valoración de la actividad de la enfermedad en EspAax, así como una propuesta de remisión clínica, que podrían contribuir a mejorar la atención de estos pacientes.

P006. RITMO LUMBOPÉLVICO EN PACIENTES CON ESPONDILOARTRITIS AXIAL COMPARADO CON SUJETOS CON DOLOR LUMBAR Y SANOS

J.L. Garrido Castro¹, I.C. Aranda Valera², S. Alcaraz Clariana³, L. García Luque³, D. Rodríguez de Sousa³, C. González Navas¹, F. Alburquerque Sendin³, L. Ladehesa Pineda², M.C. Castro Villegas², P. Gardiner⁴ y E. Collantes Estévez²

¹Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba.

²Hospital Universitario Reina Sofía. Servicio de Reumatología. Córdoba.

³Facultad de Medicina, Enfermería y Fisioterapia. Universidad de Córdoba.

⁴Western Health and Social Care Trust Hospital. Londonderry. Reino Unido.

Introducción: El dolor lumbar de espalda reduce la movilidad espinal, aunque no está claro si existen diferencias cinemáticas entre el dolor lumbar inflamatorio de la espondiloartritis axial (EspAx) y otros tipos de dolor de espalda. Recientemente han aparecido sensores de movimiento inercial que pueden medir la movilidad de manera precisa y fiable. El sistema ViMove utiliza dos sensores inerciales ubicados en L1 y S1, lo que permite que la flexión de la columna vertebral se separe en sus componentes lumbar y pélvico. La relación entre las diferentes partes de la columna vertebral durante un movimiento de flexión total se conoce como ritmo lumbopélvico. El sensor del tronco mide la flexión total, mientras que la contribución de la cadera se mide con el sensor de la pelvis, dejando la flexión lumbar como la diferencia entre los dos ángulos.

Objetivos: Analizar la relación de los ángulos lumbopélvicos en pacientes con EspAx, pacientes con dolor lumbar y controles sanos.

Métodos: Se incluyeron 92 sujetos en nuestro estudio: 56 EspAx (de la cohorte COSPAR del Hospital Universitario Reina Sofía), 14 con dolor lumbar (DL) y 22 controles sanos. El sistema basado en sensores inerciales ViMove[®] se usó para medir la movilidad lumbar. Los pacientes con EspAx se estratificaron en tres grupos según su movilidad general utilizando el BASMI: EspAx Baja (< 2), Med (2-4) y Alta (> 4)

Resultados: La tabla muestra los resultados de las pruebas de movilidad espinal en cada grupo. El tronco, la pelvis y los ángulos lumbares se expresan en grados (media y desviación estándar). cPelvis es la contribución de la pelvis al movimiento general como porcentaje. Tres de las cinco mediciones en BASMI están fuera de la columna lumbar, por lo que es poco probable que se vean afectadas en pacientes con DL. Hubo diferencias significativas en los ángulos del

Association Between Radiographic Progression and Cardiovascular Risk in Spondyloarthritis: Data from CoSpaR REGISTRY

María Lourdes Ladehesa-Pineda¹, Maria Carmen Castro², Ignacio Gomez-Garcia², Pedro Seguí-Azpilcueta³, María del carmen ábalos-Aguilera⁴, Rocío Segura-Ruiz⁵, Rafaela Ortega², Laura Bautista-Aguilar⁶, Inmaculada Aranda-Varela⁷, Clementina López-Medina⁸, Juan Luis Garrido-Castro⁹, Chary Lopez-Pedreira², Alejandro Escudero-Contreras⁷, Eduardo Collantes-Estévez⁷ and Yolanda Jiménez-Gómez⁴, ¹Universitary Hospital Reina Sofia of Cordoba/University of Cordoba/IMIBIC, Córdoba, Spain, ²IMIBIC/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain, ³Universitary Hospital Reina Sofia of Córdoba, Córdoba, Spain, ⁴IMIBIC, Córdoba, Spain, ⁵Reina Sofia University Hospital/IMIBIC, Córdoba, Spain, ⁶laurabautistaag@gmail.com, Córdoba, Spain, ⁷Universitary Hospital Reina Sofia of Córdoba/University of Córdoba/IMIBIC, Córdoba, Spain, ⁸Cochin Hospital, Rheumatology Department, Paris, France, ⁹University of Córdoba, Córdoba, Spain

Meeting: 2019 ACR/ARP Annual Meeting

Keywords: axial spondyloarthritis, cardiovascular disease and radiography

SESSION INFORMATION

Date: Sunday, November 10, 2019

Session Type: Poster Session (Sunday)

Session Title: Spondyloarthritis Including Psoriatic Arthritis – Clinical Poster I: Axial Spondyloarthritis, Clinical Features

Session Time: 9:00AM-11:00AM

Background/Purpose: Our objectives are:

1. To analyze the prevalence of comorbidities related to CV risk in a register of patients with spondyloarthritis (CoSpaR).
2. To evaluate if there is an association between structural damage, the presence of atherosclerotic plaques, the endothelial function and the increased CV risk in patients with axSpA.

Methods: Eight-five patients with axSpA from the SpA registry from Cordoba (CoSpaR) were selected for a cross-sectional study. Patients were recruited in a probabilistic and sequential way from a SpA monographic ambulatory, and a complete clinical history, physical examination and a biochemical analysis were performed.

CV risk was evaluated by estimating the SCORE index and assessing the presence of atherosclerotic plaques through carotid ultrasound. The study of endothelial function was performed with laser doppler flowmetry, analyzing the response to reactive hyperemia, so as the increase in blood flow occurred after temporary occlusion of blood flow.

Data was collected and analyzed using SPSS v25 program. Independent-samples t test was used to evaluate the association between radiological characteristics and presence of atherosclerotic plaques. The linear relationship between the variables has been measured by Pearson's linear correlation coefficient. Multiple lineal regression (MLR) was performed to assess the variables

potentially associated with increased SCORE. All comparisons were bilateral considering $p \leq 0.05$ as a significant result.

Results: Baseline characteristics are shown in table 1. Characteristics related with radiographic damage and CV risk are shown in table 2. Direct linear relationship was found between the CV risk measured by SCORE index and total, lumbar and cervical mSASSS, and the presence of bone bridges. Analysis of atherosclerotic plaques at the carotid showed that age, disease duration, and variables related to radiographic damage (total mSASSS, cervical spine mSASSS, lumbar spine mSASSS, and bone bridges) were significantly higher in patients with atherosclerotic plaques ($p < 0.05$). In addition, mSASSS in cervical spine ($p = 0.063$) and age ($p < 0.0001$) were found to be associated with the SCORE index value and were predictors of increased CV risk in MLR analysis. Endothelial function (measured by Laser Doppler measurement of post ischemic reactive hyperemia) correlated inversely ($p < 0,05$) with total and lumbar mSASSS, as shown by the values of hyperemic area after occlusion was released.

Conclusion: The presence of atherosclerotic plaques in patients with axSpA is associated not only with age and disease duration, but also with the degree of radiographic damage present. Age and structural damage predicted the increased risk of CV disease observed in axSpA. Therefore, we have observed that older patients with axSpA and more structural damage, especially in the cervical spine, had a greater risk of CV disease. Endothelial dysfunction is also found in patients with axSpA.

Funded by: JA PI-0139-2017

Baseline characteristics	Mean (SD) or N(%)
Age (years) (N=85)	44,55±12,22
Sex (males) (N=85)	59 (69,4)
HLA B27 (N=83)	71 (83,5)
axSpA (N=85)	79 (92,9)
Radiographic axSpA (N=77)	63 (74,1)
Psoriasis (N=84)	10 (11,8)
BMI (kg/m ²) (N=80)	26,88± 4,13
Disease duration (years) (N=82)	18,01±13,62
Smokers (N=84)	33 (38,8)
ASDAS-CRP	3,13 ±1,05
ASAS HI (N=82)	4,05 ±3,8
BASDAI (N=84)	3,48 ±2,17
CRP (mg/L) (N=80)	6,64 ±10,86
ESR (mm/h) (N=63)	8,49 ±9,22
Arterial hypertension	16 (18,8)
Diagnosis of hyperlipaemia (N=83)	13 (15,3)

Characteristics related to structural damage and CV risk	Mean (SD) or N(%)
Total mSASSS (N=79)	14,84 ± 18,4
Cervical mSASSS (N=79)	7,27 ± 9,64
Lumbar mSASSS (N=79)	7,72 ± 10,14
Glucose (mg/dL) (N=80)	84,02 ± 14,5
Total Cholesterol (mg/dL) (N=80)	187,84 ± 33,75
HDL-cholesterol (mg/dL) (N=79)	54,92 ± 15,54
LDL-cholesterol (mg/dL) (N=78)	111,96 ± 30,91
Tryglicerides (mg/dL) (N=80)	100,68 ± 65,85
Insuline (N=70)	6,1 ± 4,1
Diabetes Mellitus (N=84)	1 (1,2)
Atherosclerotic carotid plaques (N=66)	14 (16,5)
Insuline resistance (N=85)	7 (3,4)
SCORE (N=78)	57 (67,1)
• Low CV risk	13 (15,3)
• Moderate CV risk	4 (4,7)
• High CV risk	4 (4,7)
• Very high CV risk	

Disclosure: M. Ladehesa-Pineda, None; M. Castro, None; I. Gomez-Garcia, None; P. Seguí-Azpilcueta, None; M. ábalos-Aguilera, None; R. Segura-Ruiz, None; R. Ortega, None; L. Bautista-Aguilar, None; I. Aranda-Varela, None; C. López-Medina, None; J. Garrido-Castro, None; C. Lopez-Pedrerera, None; A. Escudero-Contreras, None; E. Collantes-Estévez, None; Y. Jiménez-Gómez, None.

To cite this abstract in AMA style:

Ladehesa-Pineda M, Castro M, Gomez-Garcia I, Seguí-Azpilcueta P, ábalos-Aguilera M, Segura-Ruiz R, Ortega R, Bautista-Aguilar L, Aranda-Varela I, López-Medina C, Garrido-Castro J, Lopez-Pedrerera C, Escudero-Contreras A, Collantes-Estévez E, Jiménez-Gómez Y. Association Between Radiographic Progression and Cardiovascular Risk in Spondyloarthritis: Data from CoSpaR REGISTRY [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71 (suppl 10).
<https://acrabstracts.org/abstract/association-between-radiographic-progression-and-cardiovascular-risk-in-spondyloarthritis-data-from-cospar-registry/>. Accessed June 2, 2021.

ACR Meeting Abstracts - <https://acrabstracts.org/abstract/association-between-radiographic-progression-and-cardiovascular-risk-in-spondyloarthritis-data-from-cospar-registry/>