



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Biomarcadores de activación neutrofílica en pacientes con artritis reumatoide establecida en tratamiento con inhibidores de la IL-6 e inhibidores de JAK

Utilización de la calprotectina plasmática y niveles de NETs en plasma como marcadores de actividad de la enfermedad

Beatriz Frade Sosa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA E INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Línea de investigación: Agressió biològica i mecanismes de resposta.

**BIOMARCADORES DE ACTIVACIÓN
NEUTROFÍLICA EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE ESTABLECIDA EN
TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA IL-6
E INHIBIDORES DE JAK**

UTILIZACIÓN DE LA CALPROTECTINA PLASMÁTICA Y NIVELES DE NETS
EN PLASMA COMO MARCADORES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

BEATRIZ FRADE SOSA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Octubre de 2024

Director y Tutor:

Raimon Sanmartí Sala, Doctor en medicina, profesor de la Universidad de Barcelona

Agradecimientos

Agradecimientos

Escribo estas palabras con una profunda sensación de gratitud y aprecio al presentarles esta Tesis Doctoral. Es un momento de gran significado y emoción, ya que marca un punto y aparte de un largo viaje de investigación.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director, el Dr. Raimon Sanmartí, por su guía constante, tiempo y apoyo a lo largo de este proceso. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo y la realización de este trabajo. Agradecer su confianza en mí. Sin su esfuerzo y motivación, esta Tesis no habría sido posible.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud a todos los miembros del tribunal que han aceptado evaluar mi Tesis. Agradezco el tiempo y esfuerzo que están dedicando a leer y evaluar este trabajo.

También a mis compañeros de trabajo del Servicio de Reumatología del Hospital Clinic, cuya colaboración y apoyo han sido fundamentales en este proceso. Especial mención para el Dr. Andrés Ponce, cuya colaboración en la evaluación de los pacientes ha sido inestimable; a Lola Tobalina por estar siempre disponible para ayudar; y a Nuria Sapena, no sólo por haber colaborado en el trabajo del día a día, sino por haber sido un apoyo constante todos estos años.

También quiero dejar constancia de mi reconocimiento al Dr. José A. Gómez Puerta por brindarnos su apoyo y facilitar el camino con sus consejos. Tampoco puedo dejar de mencionar a mis compañeros Juan Camilo, Katherine, Roberto, Stanka, Helena

por ser un apoyo dentro y fuera del hospital. Ana Belén, mi co-R, por su contribución y por convertirse en una amiga desde el día en que nos conocimos.

Asimismo, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. Estibaliz Ruiz y Odette Viñas por creer en este proyecto y brindarnos su apoyo. También a la Sra. Noemi de Moner. Gracias a su compromiso y esfuerzo logramos realizar en nuestro hospital una técnica que hasta ahora no se había realizado en el centro. No puedo dejar de mencionar también a los Drs. Jordi Yagüe y Josep M^a Auge, así como a las Dra. Isabel Haro y M^a Jesús Gómara, cuya ayuda en el análisis de muestras ha sido invaluable.

Y como no, a los pacientes por su participación en el estudio. Está claro que ellos han sido la clave del proyecto.

Además, quiero expresar mi gratitud a mi familia, por su interés, ánimos, su colaboración y ayuda prestada. Especial mención a mi madre, que ha sido un ejemplo siempre a seguir y cuya experiencia ha facilitado la realización de este trabajo. Agradecer así mismo a mi familia política el apoyo. Y a Armando, gracias por haberme acompañado en este camino y haberlo hecho todo siempre fácil.

En resumen, quiero transmitir mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido de alguna manera a esta Tesis Doctoral. Sin su apoyo y aliento, este logro no habría sido posible. Espero sinceramente que este trabajo sea una contribución valiosa al conocimiento en el campo de la artritis reumatoide y pueda abrir nuevas puertas para futuras investigaciones.

Gracias de todo corazón.

Financiación

Financiación

Para la realización de los estudios presentados en esta tesis, se ha contado con el soporte financiero de la donación de Openbank a través del programa solidario "Open Solidario". Además, se ha recibido apoyo económico mediante una beca del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España, otorgada a la Dra. Isabel Haro ("Péptidos sintéticos como componentes clave en diagnóstico y terapia" PID2021-122216OB-I00).

Índice

Índice

Contenido

Abreviaturas	21
Enumeración de los artículos que componen la Tesis	27
Artículo 1	27
Artículo 2	27
Introducción	31
Justificación del trabajo	31
Funciones fisiológicas de los neutrófilos	36
Neutrófilos en la artritis reumatoide	42
Calprotectina	45
Calprotectina en la artritis reumatoide.....	51
Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).....	58
NETs en la artritis reumatoide	66
Hipótesis de trabajo	77
Objetivos	81
Material, método y resultados	85
Artículo 1	85
Resumen	85
Artículo 2	99
Resumen:	99
Discusión	125
Conclusión	138
Bibliografía	142

Abreviaturas y acrónimos

Abreviaturas

ACPA	anticuerpos antiproteínas/péptidos citrulinados
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN de doble cadena
ANCA	Anticuerpos contra las proteínas del citoplasma de neutrófilos
anti-CarP	anticuerpos anti-péptidos carbamilados
anti-rIL-6	anticuerpos monoclonales contra los receptores de IL-6
anti-TNF	fármacos inhibidores del TNF- α
APRIL	ligando inductor de la proliferación A
APs	Artritis psoriásica
AR	Artritis reumatoide
AUC	Área bajo la curva
BAFF	factor activador de las células B
BLyS	factor activador de las células B
CDAI	<i>“clinical disease activity index”</i>
CFA	antígeno asociado a la fibrosis quística
citH3	histonas citrulinadas
curva ROC	Curva características operativas del receptor
DAMP	patrones moleculares asociados a peligros
DAS28	<i>“Disease Activity Score 28”</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EII	enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	ensayo inmunoenzimático

EMMPRIN	glicoproteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas
EN	elastasa de neutrófilos
ERK1/2	quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
FAME	fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
FAMEb	fármaco antirreumático modificador de la enfermedad biológico
FAMEsc	fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintético convencional
FLS	sinoviocitos similares a los fibroblastos
FR	factor reumatoide
G-CSF	colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
IFNβ	interferón beta
Ig	inmunoglobulina
IL	interleucina
INF-I	interferones de tipo I
IRF	factor regulador del interferón
JAK/STAT	quinasa de Janus/señalizadores y activadores de la transcripción
JAKi	inhibidor selectivo de JAK quinasa
JNK	c-Jun-N-terminal
LDL	lipoproteína de baja densidad
LES	lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacáridos
LRP1	lipoproteína de baja densidad relacionada con la proteína 1

LTB4	Leucotrieno B4
Mcl-1	Proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos 1
MHC-II	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MMP	metaloproteinasas de matriz
MPO	mieloperoxidasa
MRP 8/14	proteína mieloide relacionada 8/14
NAD	Número de articulaciones dolorosas
NAI	Número de articulaciones inflamadas
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
NETosis	formación de NETs
NF-κB	factor nuclear κ B
NRAMP	proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural
p38 MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos p38
PAD	peptidil arginasa deiminasa
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	proteína C reactiva
PCRs	proteína C reactiva ultrasensible
PMN	polimorfonucleares
PR3	proteína 3
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	Ligando de RANK
RFA	reactantes de fase aguda

ROS	especie reactiva de oxígeno
S100A9/S100A8	Calprotectina
SDAI	<i>“Simplified Disease Activity Index”</i>
Spa	espondiloartropatías
TICAM1	proteína adaptadora inductora de interferón beta
TLR	receptores tipo Toll
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
TRIF	proteína adaptadora inductora de interferón beta
TTT	Treat-to-target
VGP	valoración global del paciente
VSG	velocidad de sedimentación globular

Enumeración de los artículos que componen la Tesis

Enumeración de los artículos que componen la Tesis

Tesis en formato de compendio de artículos

La tesis consta de 2 artículos:

Artículo 1

Plasma calprotectin as a biomarker of ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis patients receiving IL-6 antagonists or JAK inhibitors.

Frade-Sosa B, Ponce A, Inciarte-Mundo J, Morlà R, Ruiz-Esquide V, Macías L, Azuaga AB, Ramirez J, Cañete JD, Yagüe J, Auge JM, Gomez-Puerta JA, Sanmarti R.

Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. 2022.

- doi: 10.1177/1759720X221114105
- Factor de impacto: 3.625
- Cuartil: Q2
- Área y categoría: Medicina, Reumatología

Artículo 2

Neutrophilic Activity Biomarkers (Plasma Neutrophil Extracellular Traps and Calprotectin) in Established Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biological or JAK Inhibitors: A Clinical and Ultrasonographic Study.

Frade-Sosa B, Ponce A, Ruiz-Ortiz E, De Moner N, Gómara MJ, Azuaga AB, Sarmiento-Monroy JC, Morlà R, Ruiz-Esquide V, Macías L, Sapena N, Tobalina L, Ramirez J, Cañete JD, Yagüe J, Auge JM, Gomez-Puerta JA, Viñas O, Haro I, Sanmarti R.

Rheumatology and Therapy. 2024.

- doi: 10.1007/s40744-024-00650-9
- Factor de impacto: 3.8
- Cuartil: Q1
- Área y categoría: Reumatología

Introducción

Introducción

Justificación del trabajo

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica, inflamatoria y sistémica caracterizada por inflamación, hiperplasia sinovial y destrucción del cartílago articular, con afectación predominante de pequeñas articulaciones periféricas. Sin el tratamiento adecuado, puede conducir a la destrucción del cartílago articular y formación de erosiones ósea (1). Por su naturaleza inflamatoria sistémica, puede causar manifestaciones extraarticulares como nódulos reumatoides, enfermedad intersticial pulmonar o vasculitis, así como la aparición acelerada de aterosclerosis o el mayor riesgo de osteoporosis. Los pacientes con AR presentan, además, deterioro de su calidad de vida, mayor discapacidad y morbimortalidad (2).

En las últimas décadas, el pronóstico de la AR ha mejorado de manera significativa gracias a los avances en el tratamiento. El inicio temprano de la medicación, la inclusión de nuevas dianas terapéuticas y la implementación de estrategias de tratamiento por objetivos, conocida como estrategias “*treat-to-target*” (TTT) (3), han sido clave en este proceso.

La estrategia TTT promueve el ajuste del tratamiento hasta alcanzar el objetivo terapéutico, basándose en la valoración frecuente de la actividad de la enfermedad, utilizando índices articulares compuestos previamente validados. Esta estrategia necesita de biomarcadores para guiar las decisiones terapéuticas en los pacientes que reciben tratamiento con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME). En pacientes que no logran el objetivo terapéutico (remisión o baja actividad de la enfermedad) utilizando una primera estrategia con FAME sintéticos convencionales (FAMEsc) (metotrexato, leflunomida o sulfasalacina), se recomienda una segunda

estrategia usando terapias dirigidas, con FAME biológico (FAMEb) o con un inhibidor selectivo de JAK (JAKi)(4). En esta segunda estrategia se incluyen, entre otros, los anticuerpos monoclonales contra los receptores de la interleucina (IL) 6 (anti-rIL-6) como tocilizumab y sarilumab; y los JAKi como el tofacitinib, baricitinib y, más recientemente, upadacitinib y filgotinib. Estos tratamientos han demostrado mejoras significativas en los resultados clínicos y radiológicos de los pacientes con AR (5,6).

En la práctica clínica se utilizan reactantes de fase aguda (RFA), como la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG), para monitorizar la actividad inflamatoria de la AR. Dichos parámetros se incluyen también en los índices compuestos de actividad de la enfermedad, como el *Disease Activity Score 28* (DAS28) o el *Simplified Disease Activity Index* (SDAI), utilizados para el seguimiento de los pacientes (7,8). Sin embargo, los RFA no siempre reflejan de manera precisa el grado de sinovitis en los pacientes con AR y pueden influenciarse por diversos motivos como la edad, el sexo, las comorbilidades (por ejemplo, anemia en el caso de la VSG) o por el tipo de terapia antirreumática utilizada. Este sería el caso concreto de los dos grupos de terapias dirigidas que queremos estudiar: los anti-rIL-6 y los JAKi (9,10).

La IL-6 es el más potente inductor de la reacción sistémica de fase aguda. Es bien conocido que en los pacientes tratados con anti-rIL-6, los RFA clásicos no reflejan de forma satisfactoria el grado de inflamación que sufre el paciente, ya que su producción quedaría abortada con estos tratamientos sin que esto se refleje necesariamente en una mejoría sustancial de la sinovitis (11,12). Aunque menos conocido y estudiado, esta circunstancia se daría también en pacientes tratados con JAKi, donde la acción sobre los RFA es muy significativa (12–16).

Este problema ha supuesto que, en los últimos años, la investigación sobre nuevos marcadores séricos de actividad de la enfermedad en pacientes AR haya sido un campo de especial interés, siendo objeto de numerosos estudios.

Cada vez hay más evidencia de que los neutrófilos son una pieza central en la patogenia de la AR, con un papel clave en el inicio y la perpetuación de la enfermedad. En los últimos años, el interés sobre la función de estas células en la AR ha crecido sustancialmente (17). Los neutrófilos tienen un papel central en la sinovitis, pero también desempeñan sus funciones modulando la respuesta del sistema inmunológico (18,19). Son células que, al activarse de manera inapropiada por citocinas, quimiocinas y anticuerpos, favorecen la inflamación y el daño en los tejidos(20).

La calprotectina (S100A8/S100A9) es una proteína expresada principalmente por las células del sistema inmune innato, fundamentalmente por los neutrófilos, y que es liberada al medio extracelular en respuesta a estímulos inflamatorios (21). Esta proteína está presente en grandes cantidades en la sinovial reumatoide (22), y ha sido estudiada como marcador de actividad en pacientes con AR. Se ha descrito que presenta una buena correlación con la actividad de la artritis, siendo incluso más precisa que los RFA clásicos (PCR y VSG) a la hora de reflejar el estado clínico del paciente (23–25). Se ha observado, además, como es un buen marcador de progresión radiológica (26), de respuesta terapéutica a determinados FAMEs (27), así como un biomarcador que podría ser útil a la hora de predecir pacientes en riesgo de padecer un brote de la enfermedad, a pesar de estar aparentemente controlados (28). Algunas de estas investigaciones han sido realizadas en nuestro Servicio y han sido objeto de una Tesis Doctoral (Dr José Inciarte-Mundo Universidad de Barcelona, año 2017).

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés “*neutrophil extracellular traps*”) son estructuras extracelulares compuestas por moléculas antimicrobianas externalizadas por los neutrófilos, que pueden atrapar, inmovilizar, inactivar y matar microorganismos, además de activar otras células del sistema inmune. Están formadas por histonas, ADN y proteínas de los neutrófilos, como la elastasa (EN) o la mieloperoxidasa (MPO)(29). Las NETs se forman durante un proceso llamado NETosis, que es un eslabón importante de la respuesta inmune innata. Su formación puede ser desencadenada por diferentes estímulos, tanto infecciosos como estériles (por ejemplo, autoanticuerpos o inmunocomplejos) (18).

Son varios los estudios que han observado que en los pacientes con AR existe una mayor formación de NETs en comparación con población sana (30) y que estas son un posible biomarcador de la enfermedad (31). También se ha sugerido que las NETs contribuirían a la patogenia de la enfermedad, al ser fuente potencial de autoanticuerpos (anticuerpos antiproteínas/péptidos citrulinados (ACPA) y anti-péptidos carbamilados (anti-CarP))(32). La medición de los niveles de las NETs como biomarcador de actividad de AR ha sido evaluada en los últimos años. Varios estudios han encontrado correlación entre los niveles de las NETs en sangre periférica y la actividad inflamatoria de la enfermedad en pacientes con AR (32–34).

Por tanto, para una mejor monitorización de la actividad de la enfermedad y seguir una estrategia TTT, en los pacientes con AR existe la necesidad de identificar nuevos biomarcadores de actividad. Esto es especialmente relevante en aquellos tratados con fármacos que inhiben la síntesis de los RFA clásicos. Con esta Tesis Doctoral queremos estudiar si la determinación de marcadores de activación de los neutrófilos (calprotectina y las NETs) podrían ser de utilidad como marcadores que reflejen de

manera más precisa que los RFA clásicos el estado de la enfermedad en los pacientes con AR, especialmente en los que están tratados con anti-rIL-6 o JAKi.

Funciones fisiológicas de los neutrófilos

En los últimos años, nuestra comprensión sobre el papel de los neutrófilos en la inflamación ha cambiado radicalmente. La percepción inicial de que los neutrófilos desempeñaban un papel pasivo y se limitaban a responder a señales externas, ha sido sustituida por la apreciación de que los neutrófilos activados pueden desempeñar la mayoría de las funciones de los macrófagos(35). También se sabe que los neutrófilos contribuyen a la patogenia de varias enfermedades, incluyendo la AR(18,20).

Los neutrófilos son células especializadas del sistema inmune innato. Son los glóbulos blancos circulantes más abundantes, representando alrededor del 60% de todos los leucocitos. Actúan como primera línea de defensa frente a patógenos invasores, al ser las primeras células reclutadas en los focos de infección o inflamación. Además, influyen en las funciones de otras células del sistema inmunitario, con un papel activo en la coordinación en el proceso inflamatorio (29).

Los neutrófilos se desarrollan a partir de las células precursoras mieloides en la médula ósea, las cuales se activan en respuesta al factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF). Moléculas como las integrinas y las selectinas, desempeñan un papel crucial en este proceso, al facilitar su liberación desde la médula ósea hacia la circulación sanguínea. En ausencia de estímulos inflamatorios, los neutrófilos maduros circulan por el torrente sanguíneo durante un corto periodo de tiempo y en 24 horas sufren apoptosis, al ser eliminados por los macrófagos residentes de la médula ósea en un proceso antiinflamatorio denominado eferocitosis(19). Durante este tiempo participan en importantes funciones fisiológicas como la reparación tisular, la coagulación y la angiogénesis (35).

Cuando detectan una amenaza, como la presencia de microorganismos o productos liberados por tejidos dañados, los neutrófilos migran a los lugares inflamados. Las propiedades de los neutrófilos circulantes son diferentes a la de los neutrófilos inflamatorios en los tejidos. Los neutrófilos inflamatorios comparten muchas de las funciones de los macrófagos, sobre todo en lo que respecta a la generación y expresión de moléculas inmunoregulatoras. Muchas de estas funciones adquiridas son el resultado de los cambios rápidos y selectivos en la expresión génica que se produce cuando los neutrófilos se activan durante la inflamación(19).

Durante esta migración, los neutrófilos activados se encuentran con cambios en su microentorno que afectan a su función y longevidad(36). En comparación con la sangre arterial, en los tejidos inflamados existe una tensión de oxígeno y pH más bajos, y contienen citocinas y otras moléculas generadas durante el proceso inflamatorio que regulan la quimiotaxis y activación de los neutrófilos y otros leucocitos. Estos factores también regulan al alza la expresión génica de los neutrófilos, lo que produce cambios en sus propiedades, como la alteración en la expresión de receptores clave de la membrana plasmática (37). Además, en los tejidos inflamados, los neutrófilos expresan muchas quimiocinas y citocinas que pueden afectar a la función de otras células inmunitarias o de los propios neutrófilos(38). Del mismo modo, el aumento de la expresión génica altera la expresión de las proteínas que controlan la apoptosis de los neutrófilos y, en consecuencia, hace que tengan una vida mucho más larga que los neutrófilos circulantes(36).

Eliminación de patógenos

En respuesta a las infecciones, los neutrófilos migran a lo largo de gradientes quimiotácticos hacia los patógenos en los tejidos. La IL-8 desempeña un papel esencial, al servir como señal principal que guía su migración hacia entornos inflamatorios(35). Los neutrófilos responden ante moléculas catalogadas como patrones moleculares asociados al peligro (DAMP) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de los receptores de reconocimiento de patrones, incluyendo los receptores tipo Toll (TLR) (39).

Una vez que llegan al lugar de la inflamación, los neutrófilos utilizan diversas estrategias para combatir los patógenos invasores de manera eficaz. Estas estrategias incluyen la fagocitosis, la desgranulación (que implica la liberación de péptidos antimicrobianos granulares como la MPO, la EN y las metaloproteinasas de matriz (MMP)), y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de la activación de la NADPH oxidasa. Con estos mecanismos, los neutrófilos son capaces de contribuir a la rápida eliminación de los agentes patógenos en el sitio de la inflamación (39).

Además, los neutrófilos liberan una extensa gama de quimiocinas y citocinas, desempeñando un importante papel en la modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los neutrófilos activados aumentan la expresión de los receptores de membrana plasmática, como el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), actuando como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T. Además, los neutrófilos apoptóticos son fagocitados por las células dendríticas, aumentando así los niveles de presentación de antígenos (40). En relación con las células B, éstas son

responsables de la síntesis de citocinas, clave para su desarrollo, incluyendo el factor activador de células B (BAFF o BlyS) y el ligando inductor de la proliferación A (APRIL)(7).

Cuando el neutrófilo detecta un estímulo infeccioso o inflamatorio, otro de los mecanismos de acción que presenta es mediante la formación de NETs, descrito por primera vez en el año 2004. Consiste en la formación de una red de ADN, histonas y proteínas de los neutrófilos como la MPO, la EN, la calprotectina o la calgranulina, que es expulsada por la célula al medio extracelular, y que tiene capacidad de atrapar, inmovilizar, inactivar y matar microorganismos (41) (figura 1).

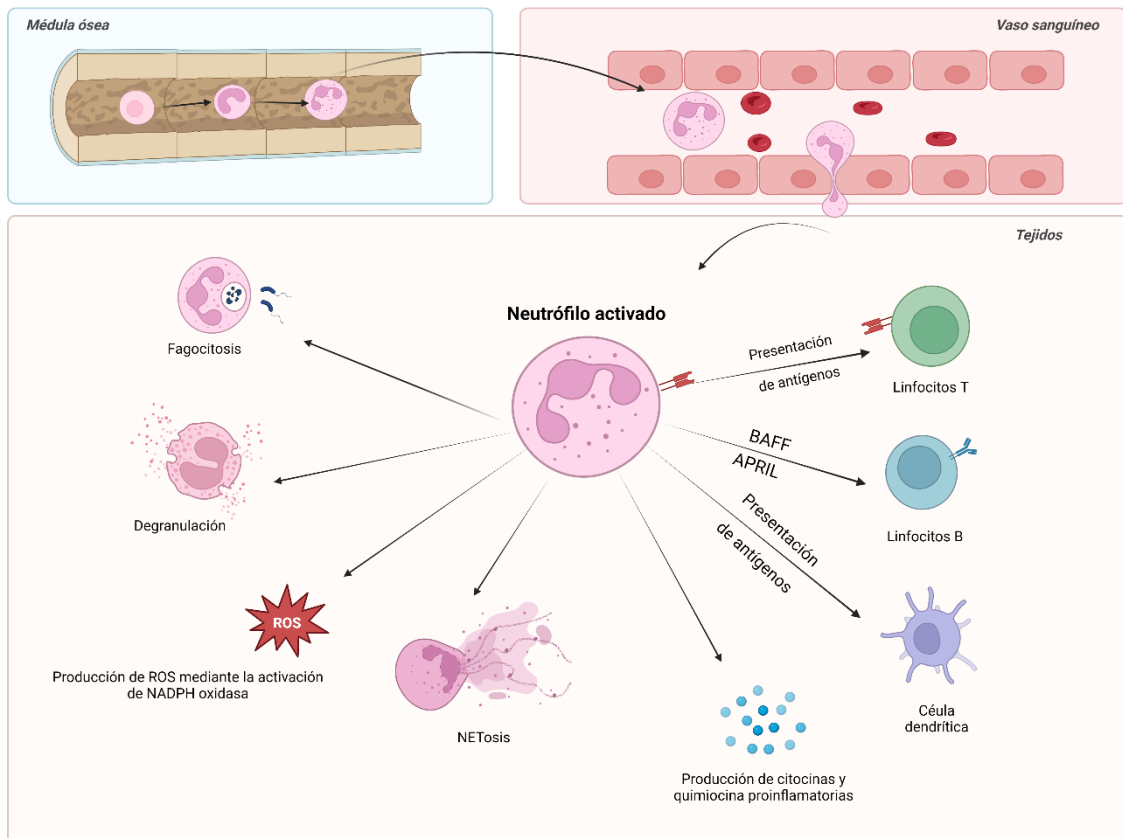


Figura 1 Funciones fisiológicas del neutrófilo en la respuesta inmune. ROS: especies reactivas de oxígeno, BAFF: factor activador de las células B; APRIL: ligando inductor de la proliferación A. Figura creada con Biorender. (42)

Resolución de la inflamación

Los mecanismos responsables del retraso de la apoptosis en los neutrófilos inflamatorios activados incluyen cambios en la expresión génica mediados por citocinas y alteraciones en los índices de recambio de proteínas clave, como la proteína de diferenciación de células de leucemia (Mcl-1)(43). Estos procesos pueden prolongar la vida útil de los neutrófilos hasta varios días. Esta vida útil prolongada permite a los neutrófilos desempeñar su función en la inflamación antes de sufrir apoptosis constitutiva cuando han finalizado su función.

Los neutrófilos apoptóticos son células inactivas, debido a su programa de apagado y desactivación de sus vías de señalización. También expresan receptores en su superficie que permiten su reconocimiento y fagocitosis por parte de otras células fagocíticas. Esto evita la liberación de sustancias citotóxicas en los tejidos y el consiguiente daño tisular que ocurriría si los neutrófilos murieran por necrosis. Por lo tanto, es crucial que los neutrófilos apoptóticos sean eliminados de manera efectiva por las células fagocíticas para resolver la inflamación(35).

Sin embargo, en las enfermedades inflamatorias, la desregulación de la apoptosis de los neutrófilos puede prolongar su supervivencia en los tejidos inflamados, lo que conlleva la liberación prolongada de sustancias inmunorreguladoras, quimiocinas y productos citotóxicos derivados de los neutrófilos, y puede resultar en una inflamación persistente. Además, los neutrófilos apoptóticos expresan autoantígenos en su superficie, lo que puede dar lugar a la producción de autoanticuerpos si su eliminación no ocurre de manera adecuada(35).

El neutrófilo en las enfermedades reumáticas inmunomediadas

Las enfermedades reumáticas inmunomediadas son un conjunto de patologías que se caracterizan por una respuesta inflamatoria inadecuada del sistema inmune, que pierde la capacidad de diferenciar lo propio de lo ajeno (44). Estas enfermedades son ampliamente heterogéneas en su forma de presentación clínica, sin embargo, comparten la característica de tener una desregulación significativa en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Además, muchas de estas enfermedades se asocian con la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios intra- y extracelulares (45).

Los mecanismos patogénicos investigados en las enfermedades reumáticas inmunomediadas se han centrado durante muchos años principalmente en las alteraciones de la respuesta inmunitaria adaptativa, específicamente en las alteraciones en los linfocitos B y T. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la evidencia sobre la contribución significativa de los neutrófilos en estas enfermedades, destacándose como una de las principales causas de daño. Los neutrófilos no sólo se infiltran en los tejidos afectados, sino que también se ha documentado su participación en la producción de anticuerpos dirigidos contra sus propios componentes, lo que resalta su papel predominante en la autoinmunidad (46).

En pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas, como la AR, se ha observado como los neutrófilos tienen la capacidad de crear un ambiente altamente inflamatorio mediante la producción aumentada de ROS y de citocinas inflamatorias como la IL-6 o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (47,48). Además, condicionan una activación inapropiada de las células dendríticas y la cascada del complemento (49). Todo esto puede conducir la generación de modificaciones antigénicas en las proteínas,

lo que a su vez puede provocar la formación de autoantígenos, que desencadenarían la activación de las células del sistema inmune adaptativo y la producción de anticuerpos específicos dirigidos contra ellos (40).

Neutrófilos en la artritis reumatoide

La AR es una enfermedad autoinmune sistémica crónica caracterizada por dos familias de autoanticuerpos: el factor reumatoide (FR), una inmunoglobulina (Ig), de predominio IgM, dirigida frente a la porción Fc de la IgG, y los ACPA (40). Esta enfermedad está causada por una disfunción del sistema inmunitario, que incluye la expansión clonal de linfocitos autoinmunes, la generación de autoanticuerpos y la sobreproducción de citocinas y otros mediadores inflamatorios. Durante muchos años, se pensó que la principal contribución de los neutrófilos en la patogenia de la AR era por su capacidad para liberar productos citotóxicos: de todas las células implicadas en la patogenia, los neutrófilos son las que tienen un mayor potencial citotóxico (17). No obstante, hoy en día se reconoce a los neutrófilos como actores clave en la enfermedad, desempeñando un rol activo en la respuesta inflamatoria mediante la regulación de otras células del sistema inmune (18,19).

Esta regulación está mediada, en primer lugar, por la secreción de una amplia gama de quimiocinas y citocinas que regulan la función de casi todas las demás células inmunitarias. Por otro lado, existe un aumento de la expresión de receptores de la membrana plasmática, como los antígenos MHC-II, que permiten a los neutrófilos presentar antígenos a las células T (18,19). En comparación con los individuos sanos, los neutrófilos de los pacientes con AR tienen una funcionalidad significativamente diferente, incluyendo una mayor capacidad migratoria y de supervivencia celular,

mayor actividad inflamatoria, un incremento en los procesos de estrés oxidativo; así como en la liberación/formación de las NETs (18). En comparación con los neutrófilos de individuos sanos, en los pacientes con artritis se han identificado notables diferencias en la expresión de genes y proteínas, como niveles más elevados de TNF- α y proteinasa 3(PR3) (19). En modelos experimentales de AR se ha probado como la inhibición funcional o la depleción de los neutrófilos consigue reducir de manera significativa la inflamación y el daño óseo (50).

Los neutrófilos en la AR expresan diversos receptores de quimiocinas y liberan altos niveles de varios mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-17 β , IL-20, IL-22, leucotrienos B4 (LTB4) y la proteína recombinante CXCL5. Expresan además proteínas antiapoptóticas (Mcl-1, G-CSF, el factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), interferón-gamma (IFN- γ) e IL-15), que actúan aumentando la capacidad migratoria de los neutrófilos a la sinovial y prolongando la supervivencia celular dentro de la articulación hasta varios días (19,51). Del mismo modo que los macrófagos y que las células dendríticas, los neutrófilos también pueden actuar como células presentadoras de antígenos ante las células T al expresar moléculas MHC-II. Además, la activación del TNF- α puede inducir a la expresión de BlyS, que regula varias características de la fisiología de los linfocitos B, sugiriendo que puede ser un actor importante en el desarrollo de la AR. Se ha hipotetizado que la liberación de BlyS por parte de los neutrófilos puede conducir a la autoinmunidad de células B en la AR(52) .

Tanto en el pannus como en el líquido sinovial de la articulación sinovial de los pacientes con AR se encuentran grandes cantidades de neutrófilos activados. Su supervivencia está aumentada debido a las condiciones presentes en estas articulaciones, como la hipoxia y presencia de citocinas y autoanticuerpos. Un trabajo

de N. Barbarroja y colaboradores publicado en el año 2014 mostró como los ACPAs podían actuar como inductores directos del estado inflamatorio y oxidativo en los neutrófilos circulantes, lo cual se demuestra por los niveles aumentados de ROS y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (Mcl-1, IL-8 e IL-23) (53).

Así mismo, la formación de NETs se ve inducida por acción de las citocinas y los autoanticuerpos. Las NETs contienen numerosas enzimas de los neutrófilos, como la MPO, NE o la NADPH oxidasa, proteínas con modificaciones postraduccionales, como la citrulinación, y proteínas peptidil arginasa deiminasa (PAD), que representan una fuente de generación de nuevos autoanticuerpos que activarán a los linfocitos B para producir autoanticuerpos adicionales. Además, las NETs pueden inducir la expresión de IL-8 e IL-6 en los fibroblastos sinoviales (FLS). Los FLS activados en las articulaciones de AR también aumentarán la expresión de IL-8. Estas citocinas, a su vez, pueden inducir la infiltración de más neutrófilos en la sinovial y mayor formación de NETs, promoviendo así el daño óseo(54).

Los neutrófilos secretan ligando de RANK (RANKL), que está implicado en la activación de los osteoclastos (17). En el líquido sinovial de los pacientes con AR se encuentran en grandes concentraciones las proteínas de los gránulos de los neutrófilos. Estas proteínas pueden ser responsables del daño que se produce en el cartílago y en el tejido, de la activación de citocinas y receptores solubles, así como de la inhibición de la proliferación de condrocitos y de la proliferación e invasión de sinoviocitos. Es importante destacar que estas proteínas pueden actuar sinérgicamente para perpetuar la inflamación y el daño en la articulación en la AR (19).

Los neutrófilos activados también secretan calprotectina(S100A9/S100A8), una proteína con un papel importante en la cascada inflamatoria como desencadenante de

la quimiotaxis, migración de fagocitos y la modulación de diversas funciones de los macrófagos. La calprotectina actúa como un factor proinflamatorio de la respuesta inmunitaria, al comportarse como un DAMP endógeno a través de la activación de TLR4, pudiendo inducir por esta vía también la formación de NETs (55).

Calprotectina

La calprotectina (S100A9/S100A8) es una proteína perteneciente a la familia de proteínas S100, con una función específica vinculada a la inmunidad innata. Esta proteína se expresa principalmente en los neutrófilos, monocitos y macrófagos, representando aproximadamente el 40% de las proteínas del citosol de estas células. Además, bajo estímulos específicos, la calprotectina puede ser expresada en otras líneas celulares, como los osteoclastos y los queratinocitos (56–58).

Desde su descubrimiento hace más de tres décadas, la calprotectina (S100A9/S100A8) ha sido conocida por varios nombres, incluyendo proteína L1 (59), antígeno asociado a la fibrosis quística (CFA)(60), calgranulinas A y B (61), S-100a y b (62) o proteína mielóide relacionada 8 y 14 (MRP 8/14)(58).

En otras áreas de la medicina, como la gastroenterología, es reconocida como un biomarcador establecido, siendo utilizada su determinación en heces como marcador de actividad de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (63–67).

En los últimos años el interés en esta proteína como marcador de actividad y daño en enfermedades reumáticas ha aumentado de manera significativa. Se ha investigado como un importante factor proinflamatorio de la respuesta inmunitaria innata. Específicamente en la AR, la calprotectina parece tener un rol crucial en la

cascada inflamatoria, actuando como desencadenante de la migración de fagocitos, quimiotaxis, y como modulador de diversas funciones de los macrófagos (68–70).

Estructura molecular de la calprotectina

La calprotectina es una molécula heterodimérica de 36,5 kDa compuesta por dos cadenas pesadas y una ligera unidas de forma no covalente con calcio y zinc (71). Consta de dos subunidades, S100A8 y S100A9, de 8,3 kDa y 13,3 kDa, respectivamente (72). La S100A8 es la subunidad activa, mientras que la S100A9 actúa como subunidad reguladora, impidiendo la degradación temprana de S100A8. Esta proteína se encuentra principalmente en forma de heterodímeros (S100A9-S100A8) o tetrámeros (S100A9-S100A8)₂, unidos de forma dependiente del calcio (73). Su estructura de mano-EF está compuesta por dos α -hélices que flanquean un bucle central de unión al calcio, dando lugar a los clásicos dominios hélice-bucle-hélice (74).

El gen que codifica las subunidades de la calprotectina se localiza en el grupo de genes del cromosoma humano 1q12-1q21 (75,76).

Funciones de la calprotectina

La calprotectina desempeña diversas funciones, tanto intracelulares como extracelulares.

A nivel intracelular, interactúa con los componentes del citoesqueleto, como los microtúbulos, los filamentos de actina, la vimentina y la queratina, de forma dependiente del calcio, y se reorganiza en tetrámeros bajo altas concentraciones de calcio. Esta reestructuración le permite su translocación a la membrana celular y la polimerización de la tubulina. Este proceso está regulado por la fosforilación de la

treonina en la posición 113 de la S100A9, mediada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 (p38 MAPK)(77)(figura 2).

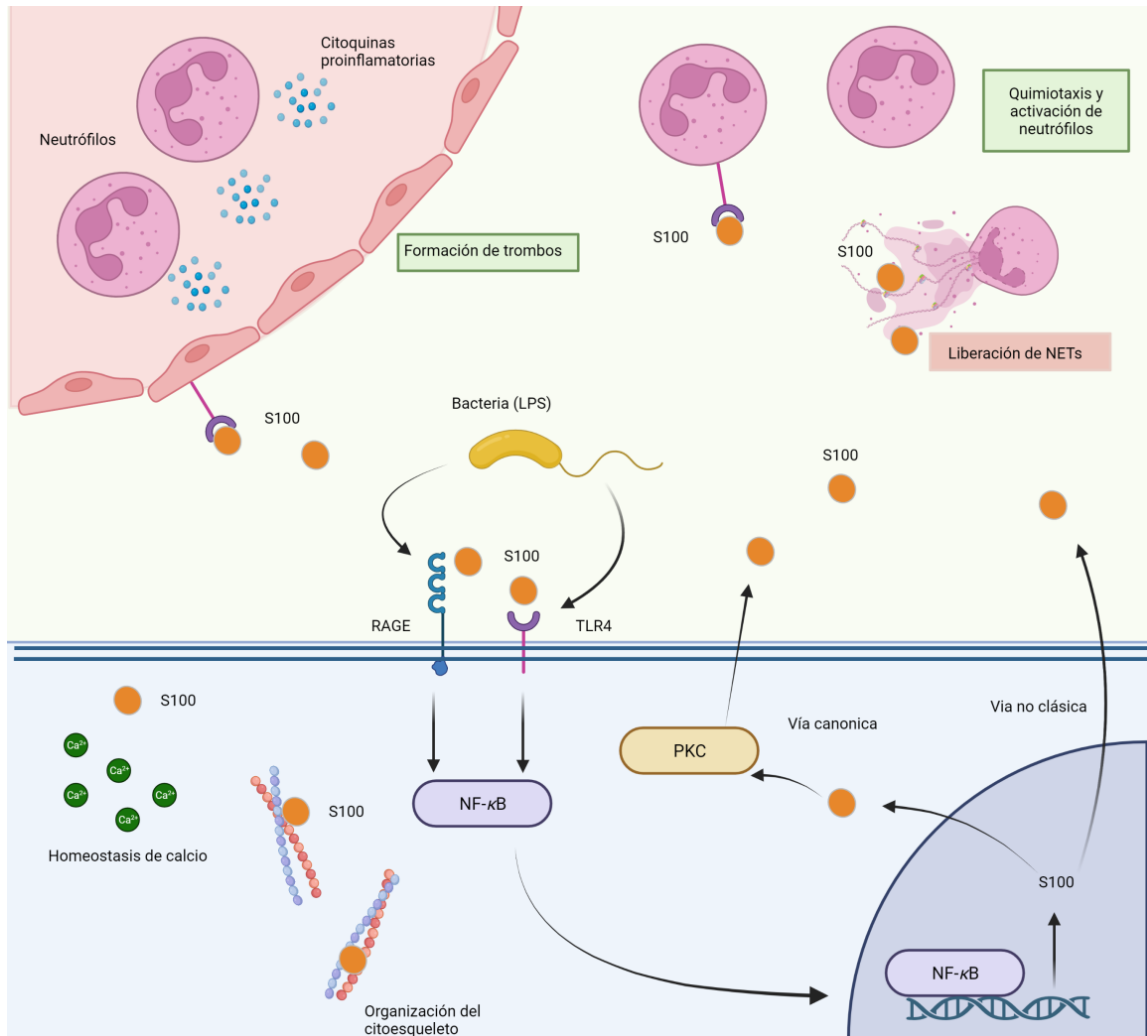


Figura 2 Función de la calprotectina. Representación gráfica de las diferentes funciones intra y extracelulares de la calprotectina. Las funciones intracelulares se muestran en azul y las extracelulares en verde. Calprotectina Las funciones intracelulares incluyen la migración celular del citoesqueleto y la homeostasis del calcio. Las funciones extracelulares incluyen la activación de las células endoteliales, promoviendo la adhesión de los fagocitos al endotelio vascular y la formación de trombos. También aumenta la quimiotaxis y la activación de los polimorfonucleares (PMR). Por último, la calprotectina ejerce una fuerte acción antimicrobiana contra una variedad de patógenos bacterianos y fúngicos. Creado con BioRender. (55)

A nivel extracelular, la calprotectina tiene función autocrina y paracrina, y desempeña un papel central en la promoción de la adhesión de los fagocitos con el endotelio vascular y la formación de trombos (78,79). Los complejos extracelulares de

calprotectina interactúan con las células endoteliales uniéndose al heparán sulfato, específicamente, a los glucanos carboxilados, regulando al alza los receptores de integrina de los leucocitos. Esto activa las células endoteliales haciendo que expresen un perfil de citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-8 o la proteína quimioatrayente de monocitos 1(MCP-1). Además, genera un bucle de retroalimentación positiva, aumentando la quimiotaxis y la activación de los polimorfonucleares (PMN), principal fuente de calprotectina (80). Cabe destacar que la interacción de la calprotectina con el endotelio no activado inhibe su secreción, lo que significa que la calprotectina sólo se libera en los lugares de inflamación por los fagocitos activados.

La calprotectina se libera a compartimentos extracelulares a través de diversas vías de activación, incluyendo una vía canónica, una secreción no clásica y una liberación asociada a las NETs (73,81). Además, la calprotectina puede ser secretada de forma pasiva por las células apoptóticas (80) (**Figura 2**).

La calprotectina ejerce una fuerte acción antimicrobiana al reconocer proteínas relacionadas con las bacterias, como los lipopolisacáridos (LPS), y regulando al alza la producción de citocinas de perfil proinflamatorio, como el TNF- α , la IL-1 β o IL-12 a nivel local (82,83). Se reconoce como un DAMP endógeno y se une al receptor TLR4 y a RAGE, amplificando la respuesta inmunitaria innata e induciendo el reclutamiento de más PMN a los tejidos inflamados (84). La actividad antibacteriana de la calprotectina se debe al secuestro de metales de transición por quelación de magnesio y zinc (85). La fagocitosis de las bacterias por los macrófagos conduce a una disminución de la captación de zinc y un aumento su salida desde el citoplasma, además de la salida de magnesio y hierro desde el fagosoma mediante los transportadores de la familia de proteínas de

macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP, por sus siglas en inglés “Natural-resistance-associated macrophage protein”) (86).

La calprotectina también activa las vías de señalización dependientes de MyD88 y de la proteína adaptadora inductora de IFN β (TRIF); también conocida como TICAM1, que contiene el dominio TIR, dando lugar a la transcripción de genes mediada por factor nuclear κ B (NF- κ B) y por el factor regulador del interferón (IRF). La EMMPRIN, una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, también es capaz de unirse a la subunidad S100A9. Sin embargo, aún no se ha descrito su función biológica (87).

En resumen, la calprotectina desempeña un papel crucial en la respuesta inmunitaria y la inflamación, tanto a nivel intracelular como extracelular, contribuyendo a la regulación de la respuesta inflamatoria y la defensa antimicrobiana.

Calprotectina en la salud y en la enfermedad

En individuos sanos, los niveles de calprotectina en sangre y en heces son mínimos, en comparación con aquellos que padecen enfermedades inflamatorias (88–91). Los niveles de calprotectina no se ven afectados por la edad ni el sexo(92).

Se han encontrado niveles más elevados de calprotectina en pacientes con enfermedades inmunomediadas, como la EII (93) o diabetes de tipo 2 (94). En la EII, la calprotectina fecal ha demostrado ser un indicador sensible de la actividad inflamatoria y se utiliza tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes en la práctica clínica habitual (95). Además, se ha visto como esta proteína está más elevada en pacientes con enfermedades infecciosas o sepsis(96), siendo un biomarcador que podría ser incluso superior a la procalcitonina en pacientes con infecciones

respiratorias(97). Recientemente se ha descrito un nuevo trastorno inflamatorio, caracterizado por infecciones recurrentes, hepatoesplenomegalia, anemia, vasculitis cutánea y evidencia de inflamación sistémica. En estos pacientes se ha descrito la presencia de hiperzincemia con hipercalprotectinemia (98). La calprotectina también ha demostrado ser un prometedor biomarcador de actividad inflamatoria en pacientes con enfermedades inmunomediadas desencadenadas por el uso de inhibidores de *check point* (99).

En pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias se ha descrito aumento en los niveles de calprotectina en sangre y en líquido sinovial (**Tabla 1**).

Enfermedad	Principales hallazgos
Artritis reactiva	<ul style="list-style-type: none"> • La calprotectina se correlaciona con la actividad de la enfermedad y con la PCR (100). • Primer biomarcador sensible de mejoría de la enfermedad (100).
Espondilitis anquilosante	<ul style="list-style-type: none"> • Calprotectina se correlaciona con VGP, EVA dolor, BASDAI, BASFI y ASDAS (101,102). • Calprotectina es un marcador independiente de progresión radiográfica (103).
Artritis psoriásica	<ul style="list-style-type: none"> • La calprotectina se encuentra significativamente más alta en pacientes con APs que en sanos (104). • Niveles más altos de calprotectina en pacientes con afectación poliarticular vs. pacientes con enfermedad mono- u oligoarticular (105). • Los niveles de calprotectina como marcador de respuesta al tratamiento con anti-TNF e iIL17 (104).
Artritis idiopática juvenil sistémica	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de calprotectina son sensibles al cambio (106) . • Calprotectina predice con mayor exactitud el rebrote (107).
Enfermedad de Still del adulto	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de calprotectina son significativamente más altos que en pacientes con AR, LES o sujetos sanos (108,109) .
Gota	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles de calprotectina elevados en la sinovial, tofo y suero (110). • Los niveles de calprotectina se correlacionan con la actividad de la enfermedad (110).
Lupus eritematoso sistémico	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de niveles de calprotectina en pacientes con nefritis lúpica (111). • Los niveles de calprotectina se correlacionan con la actividad de la enfermedad (112).
Síndrome de Sjögren primario	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la calprotectina en sangre periférica en pacientes con síndrome de Sjögren primario (113,114).
Esclerosis sistémica	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la calprotectina en los pacientes con esclerosis sistémica (115,116). • Aumento de los niveles de calprotectina en pacientes con afectación cutánea difusa (117).

Enfermedad de Behçet	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles de calprotectina más altos que en los controles sanos (118). • La calprotectina se correlaciona con la actividad de la enfermedad y la PCR (118).
Miopatías inflamatorias idiopáticas	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de niveles de calprotectina (119). • La calprotectina promueve la activación de los mioblastos (120).

Tabla 1 Calprotectina en enfermedades reumáticas. Esta tabla resume los principales resultados de los niveles de calprotectina y las enfermedades reumáticas distintas de la AR. PGA: evaluación global del paciente; EVA del dolor: escala analógica visual del dolor; BASDAI: índice de actividad de la enfermedad de la EA de Bath; BASFI: índice funcional de la espondilitis anquilosante de Bath; ASDAS: puntuación de la actividad de la enfermedad de la espondilitis anquilosante; APs: Artritis psoriásica; anti-TNF- α : inhibidores del TNF- α ; iIL17: inhibidor de la interleucina 17.

Calprotectina en la artritis reumatoide

En los pacientes con AR existe una persistente activación del sistema inmunitario innato (121). La activación inapropiada de los PMN en los pacientes con AR, en particular de los neutrófilos, desencadena la producción de varios factores proinflamatorios, incluidos la calprotectina. Esta proteína se expresa en grandes cantidades en la sinovial reumatoide y se ha sugerido que puede tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (122,123). El sitio de máxima destrucción articular en la AR es en la unión entre el cartílago y el pannus sinovial. Es a este nivel donde se observa una mayor expresión de la calprotectina (124).

En la AR, los altos niveles de calprotectina pueden tener varios efectos en las diferentes células presentes en las articulaciones. Por un lado, la calprotectina promueve la producción de marcadores inflamatorios por parte de los fagocitos. Esta activación de la calprotectina converge en múltiples vías que aumentan la producción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12/23 e IL-18, todas ellas conocidas por su relevancia fisiopatológica y clínica en la AR (72,125). Por otro lado, la calprotectina aumenta la expresión de moléculas de adhesión y promueve la migración de los fagocitos hacia las articulaciones afectadas, contribuyendo a un aumento de la inflamación articular (125).

En pacientes con AR se ha encontrado que los antígenos de calprotectina están ubicados en el cartílago sinovial, lo que sugiere un papel crucial en la destrucción del cartílago y las erosiones óseas subcondrales típicas de la AR (124). La calprotectina induce la degradación de los proteoglicanos y la apoptosis de los condrocitos. Además, estimula la producción de óxido nítrico que, junto con la activación de los condrocitos a través de la vía NF- κ B, promueve la liberación de más factores inflamatorios contribuyendo así a la destrucción del cartílago articular y a la inflamación. La calprotectina también puede activar directamente las células endoteliales, induciendo la expresión de moléculas de adhesión y aumentando la permeabilidad vascular. Además, puede incrementar la actividad de los osteoclastos, contribuyendo así a la erosión ósea observada en los pacientes con AR.

Modelos de artritis en ratones demuestran que la sobreexpresión de IL-17 y TNF- α aumenta de manera significativa la regulación al alza de la calprotectina, lo que resulta en la aparición de erosión ósea. Por el contrario, el déficit de calprotectina en ratones parece proteger contra el efecto de IL-17/TNF- α en el cartílago (126). Los niveles de calprotectina en pacientes con AR están asociados independientemente con la gravedad del daño articular y la progresión de la enfermedad a largo plazo (26,88,127). Además, se ha encontrado una correlación significativa entre los niveles de calprotectina y el edema óseo observado por resonancia magnética de las articulaciones afectas, lo que respalda su papel como biomarcador de actividad de la enfermedad (128).

La calprotectina se libera de los leucocitos activados, lo que provoca un aumento de las concentraciones en sangre periférica(129,130). Aunque inicialmente se midió su concentración en suero y en plasma mediante técnicas de ensayo inmunoenzimático (ELISA), desde la década de 1990 se ha preferido el uso de ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA)-plasma para esta medición. El EDTA tendría un efecto estabilizador sobre los niveles de calprotectina en comparación con otros anticoagulantes o en el suero, posiblemente debido a la inhibición de un transporte dependiente del calcio a través de la membrana celular (131). El EDTA se une a los iones de calcio necesarios para la coagulación, inhibiendo así el proceso de la coagulación del plasma. Este proceso implicaría la activación de las plaquetas a través del TLR4, lo que induciría la unión de las plaquetas a los neutrófilos, activándolos e induciendo la liberación de calprotectina de estos últimos. En contraste con el EDTA-plasma, el suero tiene calcio libre disponible. En presencia de calcio, se generan dímeros y oligómeros de calprotectina, lo que provoca alteraciones significativas en la estructura de la proteína(132). En un ensayo ELISA tipo sándwich, puede haber más epítopos antigénicos por anticuerpo en la cubierta disponibles para la reacción con el anticuerpo conjugado con el enzima cuando la calprotectina está presente en dímeros u oligómeros, y esto puede causar un aumento de los niveles séricos de calprotectina (133).

Calprotectina como biomarcador de artritis reumatoide

En comparación con personas sanas, los pacientes con AR presentan niveles significativamente más elevados de calprotectina en suero, plasma y en líquido sinovial (129,130). Además, un estudio proteómico reveló que las proteínas S100A8, S100A9 y S100A12 están notablemente elevadas en el líquido sinovial de pacientes con AR (134). Estos hallazgos son respaldados por la evidencia adicional, que muestra que la calprotectina, y otras proteínas de la familia S100, están reguladas al alza en el suero de los pacientes con AR, con expresiones hasta diez veces más altas en comparación con pacientes con artrosis. De hecho, la calprotectina se destacó como uno de los biomarcadores más prometedores para la AR (135). Se ha observado una correlación

entre los niveles de calprotectina y el FR, siendo más elevados en pacientes seropositivos en comparación con los seronegativos. La correlación con los títulos de ACPA aún no se ha aclarado (22,23,26,136–142).

La calprotectina también se ha vinculado con comorbilidades relevantes en la AR, como la enfermedad cardiovascular. Se ha encontrado que niveles elevados de calprotectina están asociados con la formación temprana de placas de ateroma y el desarrollo acelerado de aterosclerosis (143).

Calprotectina como biomarcador de actividad en la artritis reumatoide.

Son varios los estudios que demuestran una fuerte correlación entre los niveles en sangre periférica de calprotectina y varios índices de actividad de la enfermedad como el recuento articular del número de articulaciones inflamadas (NAI), la valoración global del paciente (VGP), el DAS28, el CDAI (*“clinical disease activity index”*) o el SDAI en comparación con los RFA clásicos PCR y VSG (23,138,139,144). Esta relación destaca especialmente en los pacientes tratados FAMEs que modifican los RFA, como los anti-IL-6, donde se produce una reducción notable de los niveles de PCR, que muchas veces es independiente de la actividad inflamatoria de la enfermedad (12,144). Tanto en pacientes con reciente diagnóstico (92,127) como en pacientes con enfermedad establecida (23), se ha observado que existe una asociación significativa entre niveles de calprotectina y parámetros de actividad(88–91,145,146).

En casos de remisión clínica, es común que los niveles de PCR y VSG se encuentren dentro de los rangos normales, aunque pueda persistir cierta actividad inflamatoria, especialmente en pacientes tratados con FAMEb o JAKi. En cambio, se ha visto como los niveles de calprotectina son significativamente más bajos en pacientes

en remisión completa (sin articulaciones inflamadas) en comparación con aquellos en los que existe alguna actividad inflamatoria residual (al menos una articulación inflamada), lo que respalda la hipótesis de que los niveles de calprotectina reflejarían la inflamación local, más que una respuesta inflamatoria sistémica (22,136,141). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación destacan la capacidad de la calprotectina para estratificar con mayor precisión que los RFA clásicos la actividad de la enfermedad en pacientes en remisión o con baja actividad de la enfermedad que reciben tratamiento con fármacos inhibidores del TNF- α (anti-TNF) (24) o tocilizumab (144). La calprotectina puede diferenciar entre pacientes sin inflamación de aquellos con al menos una articulación inflamada, a diferencia de la PCR y la VSG. Los niveles séricos de calprotectina, a su vez, se mantienen independientes de los niveles séricos de FAMEb (144). Estos resultados han sido replicados en una gran cohorte independiente (147).

Calprotectina y reactivación de la enfermedad

La calprotectina también ha demostrado ser útil en la predicción de la reactivación de la enfermedad en pacientes con AR que se encuentran en remisión o con baja actividad de la enfermedad. Estudios prospectivos han encontrado que los niveles de calprotectina podrían ser capaces de predecir de manera sólida e independiente la recaída de la enfermedad en pacientes con bajos niveles de actividad de la enfermedad durante el tratamiento con anti-TNF(148).

Esto es especialmente interesante a la hora de considerar el riesgo de recaída en los pacientes antes de disminuir la dosis de la terapia dirigida. Los estudios prospectivos DRESS y BIO-TOP (149) evaluaron la utilidad de la calprotectina para predecir las recaídas en pacientes con AR que están reduciendo la dosis de biológico. En

estos trabajos no se encontró que la calprotectina tuviera un valor añadido sobre otros factores clínicos. Por el contrario, el análisis de otros dos estudios de reducción de dosis (estudio IMPROVED y estudio RETRO) mostraron que la concentración de calprotectina en pacientes con AR en aparente remisión con FAMEs eran más altos en los pacientes que presentaron una recaída al reducir o suspender los tratamientos (150).

Calprotectina y sinovitis ecográfica

La ecografía musculoesquelética es una técnica diagnóstica no invasiva ampliamente utilizada en Reumatología para la valoración de la patología articular inflamatoria con un alto grado de sensibilidad para detectar sinovitis, mayor que la exploración física (151). Varios estudios ponen de manifiesto como los niveles en sangre de calprotectina se asocian con la actividad inflamatoria medida por ecografía, tanto con la hipertrofia sinovial (HS) como con la actividad power Doppler (PD) (146,152–154) . Un estudio realizado por nuestro grupo puso de manifiesto como en pacientes con AR y artritis psoriásica en remisión o baja actividad, pero con actividad ecográfica con señal PD, tenían niveles significativamente más altos de calprotectina sérica que aquellos sin actividad medida por ecografía. Además, se describió como la calprotectina se correlacionaba mejor con la actividad ecográfica (medida como señal PD, HS y puntuación ecográfica total) en comparación con la PCR o la VSG(28). De estos datos se pudo concluir que la calprotectina en sangre periférica y la actividad medida por ecografía, sobre todo la señal PD, identifican la sinovitis activa en pacientes con artropatías inflamatorias, incluso en aquellos con niveles bajos de actividad de la enfermedad.

Calprotectina y respuesta al tratamiento.

Predecir la respuesta individual al tratamiento constituye un verdadero desafío clínico en la AR. Estudios recientes y ensayos clínicos *post hoc* han destacado la importancia de la calprotectina para predecir la respuesta, especialmente a FAMEb, en pacientes con AR (92).

En pacientes tratados con FAMEsc, los resultados son aún inciertos, aunque se ha descrito que existen disminuciones en los niveles séricos de calprotectina, pero no de la PCR, asociadas con mejoras en el NAI con el tiempo. Los pacientes que alcanzan la remisión presentan una notable reducción de la calprotectina, y los respondedores experimentan una rápida disminución en la concentración sérica después del tratamiento, a diferencia de los no respondedores(139). En la AR temprana, un análisis *post hoc* de la cohorte prospectiva ESPOIR se ha observado que los pacientes respondedores presentan niveles basales más elevados de calprotectina que los no respondedores (155).

En lo que respecta a los pacientes que reciben terapia biológica, se ha descrito que los respondedores presentaban niveles basales de calprotectina más elevados que los no respondedores. Incluso un estudio llegó a desarrollar un algoritmo de tratamiento basado en una puntuación de predicción utilizando calprotectina, sugiriendo su potencial en el tratamiento personalizado de la AR (27,156). La asociación entre los niveles de calprotectina al inicio del tratamiento y la supervivencia de la terapia biológica también ha sido documentada(157). Aunque algunos estudios no han encontrado que los niveles basales de calprotectina predigan la respuesta al tratamiento después de 6 meses, sí han observado una disminución significativa en los niveles séricos en los respondedores (139,156,158).

En conjunto, estos datos sugieren que la calprotectina podría ser útil a la hora de monitorizar la actividad de la AR y predecir la respuesta a los FAMEb. Aunque aún faltan datos sobre pacientes que reciben FAMEsc, se necesitan ensayos aleatorios para definir mejor el papel de la calprotectina como predictor de la respuesta al tratamiento. No obstante, existe un claro potencial para la calprotectina en el seguimiento de los pacientes con AR.

Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

La formación de NETs representa un mecanismo de acción de los neutrófilos, descrito por primera vez en el año 2004 (41). Las NETs son estructuras extracelulares con forma de red que están compuestas por contenido nuclear y granular de los neutrófilos. Tienen función defensiva y además participan en la regulación de la respuesta del sistema inmunitario(159).

Estas estructuras se producen en zonas inflamatorias, en respuesta a diferentes estímulos como microorganismos, citocinas, inmunocomplejos o plaquetas (160). Durante la formación de las NETs, los neutrófilos realizan un desembalaje de su citoesqueleto, una remodelación de la cromatina y la citrulinación de sus histonas por la acción de las proteasas. La cromatina remodelada se une posteriormente a las histonas citrulinadas y a las proteínas granulares de los neutrófilos como la EN, MPO y la calprotectina; y es expulsada al medio extracelular en forma de red. Estas redes pueden atrapar, inmovilizar, inactivar y matar microorganismos (**figura 3**).

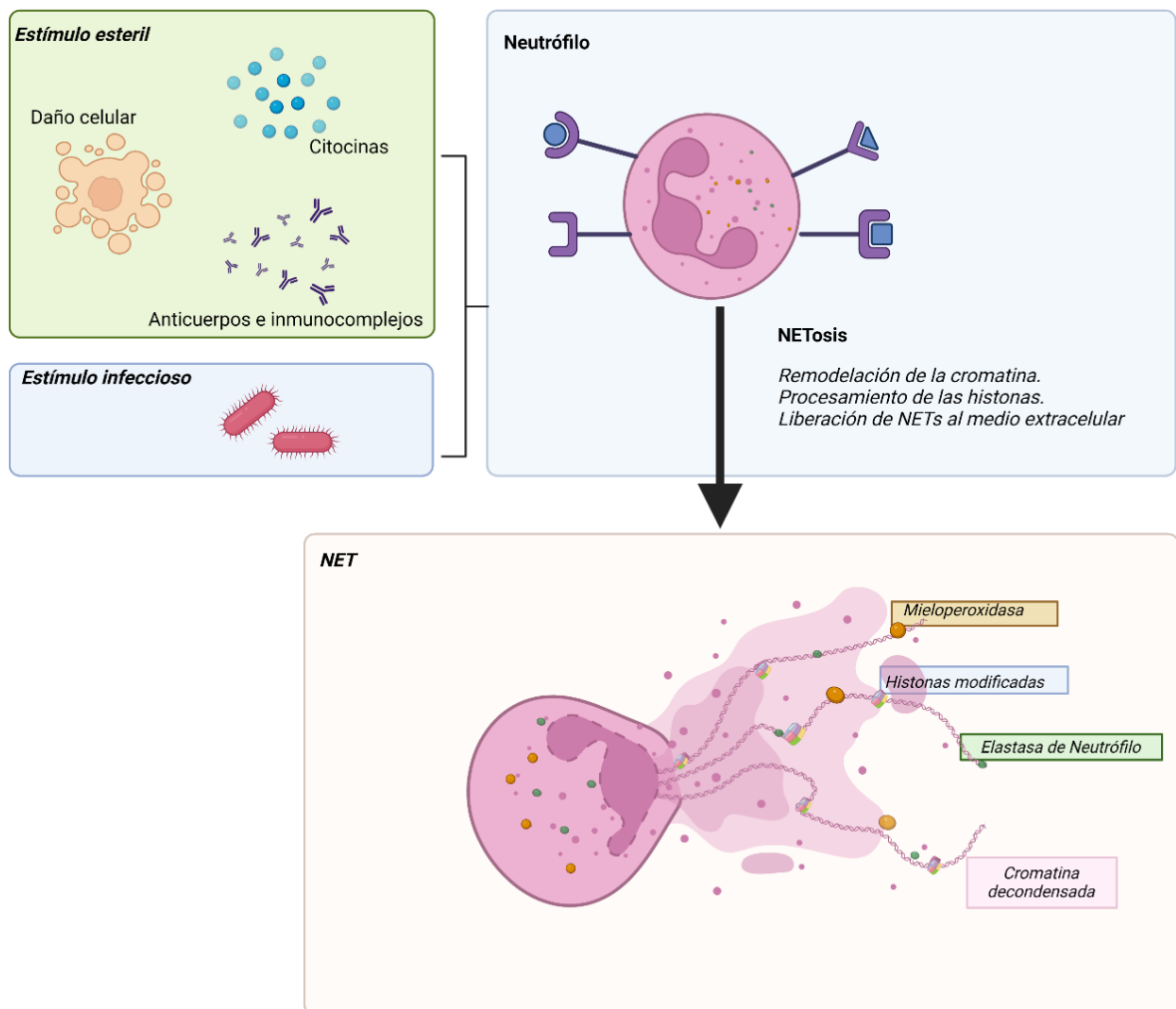


Figura 3 Trampa extracelular de neutrófilo (NET). Figura creada con Biorender (42)

No existe consenso sobre los mecanismos por los cuales se generan las NETs en lugar de activarse otro mecanismo de acción por parte de los neutrófilos. Tampoco se conocen cuáles son los acontecimientos que llevan a su formación (17). Las NETs tienen una vida media corta y son degradadas por acción de las DNAsas locales una vez finalizada su acción (29).

El término NETosis hace referencia al proceso de formación de las NETs. Se han descrito al menos 2 mecanismos por los que se forman (161) (figura 4).

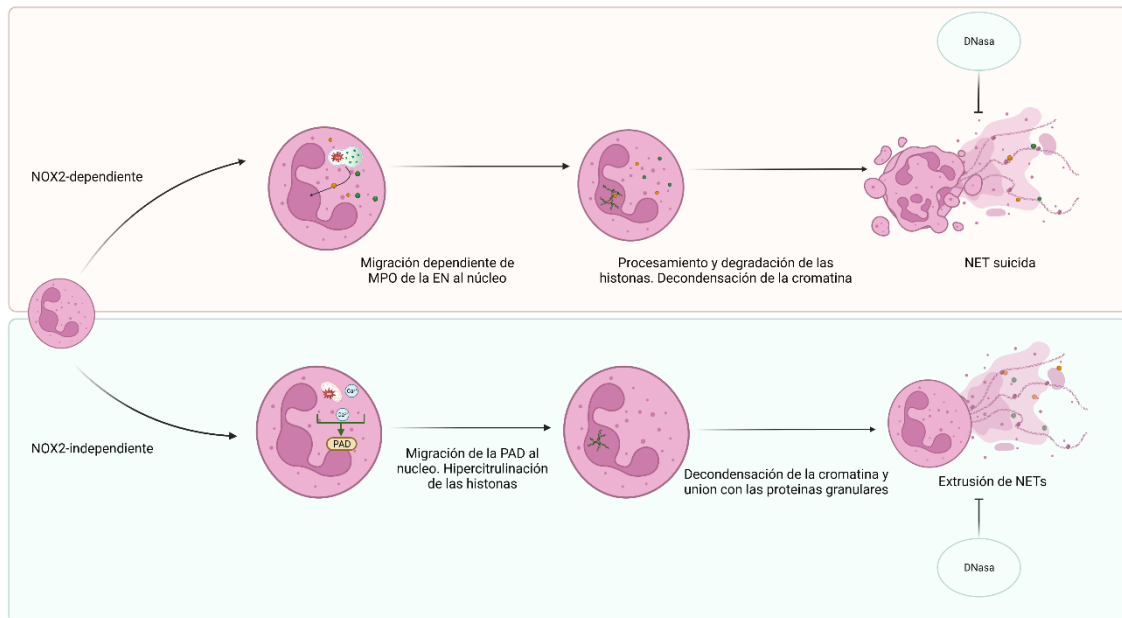


Figura 4: Tipos de NETosis. EN: elastasa de neutrófilos. MPO: mieloperoxidasa. PAD: peptidil arginasa deiminasa. Figura creada con Biorender (42)

Uno de los mecanismos de formación de NETs es la NETosis NOX2 dependiente, también conocida como NETosis suicida. Esta implica la activación de NOX2 y la liberación de ROS dentro del fagosoma. Este proceso incrementa la permeabilidad de la membrana intracelular. La NADPH oxidasa estimula la MPO, que a su vez induce la reubicación de la EN al núcleo, donde se procesan y degradan histonas. Esto conduce a la descondensación de la cromatina y a la liberación de NETs hacia el medio extracelular (162). La NETosis suicida resulta en la muerte del neutrófilo, siendo un tipo de muerte celular distinto a la apoptosis y a la necrosis. Se trata de un tipo de muerte celular programada desencadenada en respuesta a infecciones o inflamación. Es un proceso fisiológico, que resulta en la desintegración del núcleo celular, la descondensación de la cromatina y la formación de una red de fibras liberadas al medio extracelular. Por su parte, la necrosis es un tipo de muerte celular no programada, típicamente asociada con daño celular externo. Este proceso es patológico y conduce a la desintegración de la membrana nuclear, edema celular y liberación de contenido intracelular. Por último, la

apoptosis es otra forma de muerte celular programada que puede ser tanto fisiológica como patológica. Se desencadena en respuesta a señales internas o externas y se caracteriza por la condensación del núcleo, fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por otras células. A diferencia de la NETosis y la necrosis, la apoptosis no desencadena una reacción inflamatoria (163,164).

El otro tipo de NETosis es la independiente de NOX2. En este proceso, la formación de NETs no depende de la liberación de ROS por la NOX2. En cambio, las ROS mitocondriales se combinan con un aumento en los niveles de calcio intracelular para activar enzimas como las PAD (por ejemplo, la PAD4), lo que resulta en la hipercitrulinación de las histonas, la descondensación de la cromatina y la posterior liberación de NETs (29).

Diversas proteínas y sustancias proinflamatorias inducen la liberación de NETs, como la IL-8, LPS, óxido nítrico o TNF- α (29). Se ha descrito que en función del estímulo dependerá el tipo de NETosis y la función de las NETs (50).

Una vez ha concluido el proceso inflamatorio, las NETs son eliminadas del medio extracelular mediante las células fagocíticas, la secreción de factores antiinflamatorios, y la actividad de DNasas locales. Es particularmente relevante el papel de las DNasa I, que se encuentran en los lisosomas de los fagocitos y tienen capacidad de degradar el ADN presente en las NETs. Se ha observado como la deficiencia de DNasas se relaciona con la acumulación de las NETs en los tejidos (165). La acumulación de las NETs del medio extracelular debido a su falta de eliminación podría contribuir a la cronicidad de la inflamación y la perpetuación de la enfermedad(165). En consecuencia, un adecuado equilibrio entre la formación y eliminación de las NETs es fundamental para

mantener la homeostasis del sistema inmunitario y prevenir la cronicidad de la inflamación.

Las NETs también tiene efectos antiinflamatorios. Por ejemplo, las NETs agregadas pueden formar una malla estable que degrada las citocinas utilizando las proteasas de estas estructuras; esto favorece la resolución de la inflamación impulsada por neutrófilos(166) .

NETs y autoinmunidad

En los últimos años se ha corroborado el importante papel de las células del sistema inmune innato en las enfermedades reumáticas autoinmunes. En concreto, los neutrófilos han cobrado especial protagonismo (167,168). En la actualidad la formación de NETs como estado de activación de los neutrófilos asociado a la autoinmunidad es un tema de especial interés (159).

Las NETs no son sólo un mecanismo de defensa que tienen los neutrófilos. Presentan una importante función en la regulación de la respuesta del sistema inmune y tienen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (41). Un desequilibrio en la formación y la eliminación de las NETs daría lugar a una activación inadecuada de las células inmunitarias que podrían tener resultados negativos y favorecer el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunes sistémicas. Las NETs transportan proteínas inmunoestimuladoras que pueden activar otras células del sistema inmune y promover la activación de vías de señalización importantes para la respuesta inmunitaria (160).

Las moléculas liberadas por los neutrófilos incluyen proteínas que son dianas conocidas del sistema inmune. Se ha descrito la presencia de proteínas citrulinadas en

las NETs, que tendrían una actividad patogénica directa sobre las células diana y mayores niveles de inmunogenicidad en comparación con sus versiones no modificadas. También se han encontrado las histonas metiladas, acetiladas y carbamiladas (46,169). Además, las NETs contienen el ADN de doble cadena (ADNdc); o proteínas como la PR3, EN o la MPO (29), todas ellas dianas que son autoantígenos conocidos de diferentes enfermedades autoinmunes. Esto sugiere que las NETs podrían estar asociadas con la patogenia y la generación de autoantígenos que pueden promover respuestas autoinmunes en huéspedes predispuestos.

Las proteínas de las NETs pueden provocar la liberación de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 o la IL-8, al estimular la activación del inflammasoma NLRP3 en los macrófagos. Esto provocaría al mismo tiempo una mayor activación de neutrófilos y causaría una mayor generación de NETs. Las células dendríticas plasmocitoides también pueden ser activadas por las NETs. Los péptidos presentes en estas redes hacen que las células dendríticas produzcan IFN-I y puedan desencadenar la liberación de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6 (170,171). Se ha sugerido incluso que las NETs pueden promover la polarización de los linfocitos T a un fenotipo proinflamatorio contribuyendo a inducir la respuesta inflamatoria sistémica (165). Las proteínas unidas a las NETs, como las MMP y las histonas, dañan las células endoteliales y favorecen la vasculopatía. Además, favorecen la trombosis al promover la expresión del factor tisular, que activa las plaquetas y los factores de coagulación. Los autoanticuerpos, los complejos inmunes, los autoantígenos, los factores de activación del complemento y las citocinas pueden activar neutrófilos e inducir NETosis (**figura 5**).

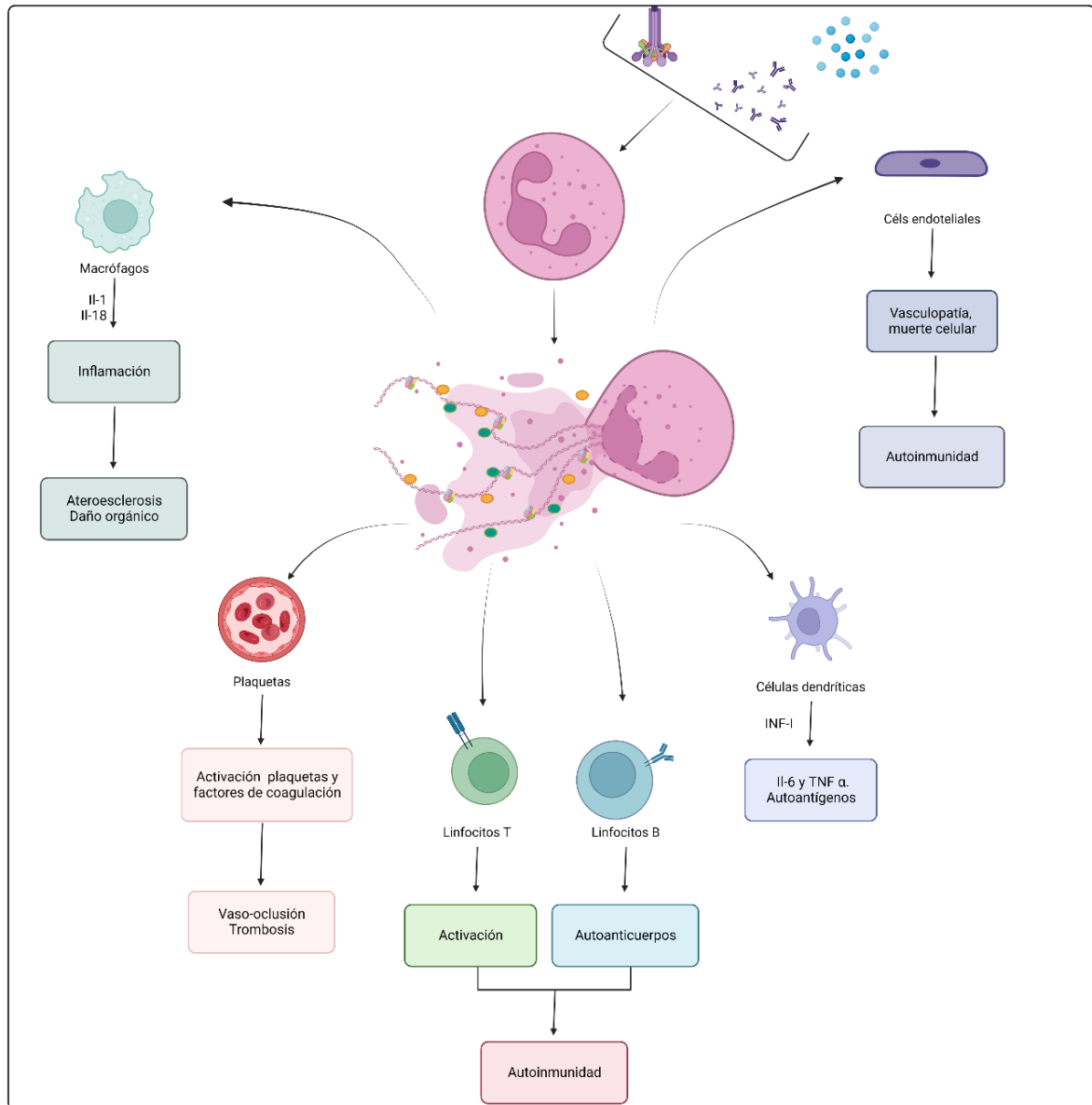


Figura 5 Relación entre NETs y autoinmunidad. Las NETs transportan proteínas inmunoestimuladoras que pueden activar otras células inmunitarias (macrófagos, células dendríticas, linfocitos), además contienen autoantígenos que pueden desencadenar respuestas autoinmunes mediadas por autoanticuerpos. Además, las proteínas unidas a NET pueden dañar las células endoteliales y promover la trombosis. Los autoanticuerpos, los complejos inmunes, los autoantígenos, los factores de activación del complemento y las citocinas pueden activar neutrófilos e inducir NETosis. Figura creada con Biorender. (42)

NETs en las enfermedades reumáticas autoinmunes

La formación incrementada de NETs se ha asociado con varias enfermedades reumáticas autoinmunes. Además de con la AR, se ha vinculado con enfermedades como el lupus eritematoso sistémico, las miopatías inflamatorias, las vasculitis asociadas

a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) o el síndrome antifosfolípido. Así mismo, las NETs se han vinculado con la formación de trombos característica de los pacientes con enfermedad inflamatoria crónica (172) (**tabla 2**).

Enfermedad	NETs	Principales hallazgos
Lupus eritematoso sistémico	Formación y eliminación de NETs desregulada (173).	<ul style="list-style-type: none"> • Papel directo en el daño tisular (46). • Presencia de NETs en piel y glomérulos (29) • Proteínas de las NETs se correlacionan con la actividad de la enfermedad. • Alteración en actividad de DNasas (174,175). La degradación de NETs se considera que marca un paso temprano en la patogenia. Factor clave en la ruptura de la tolerancia inmunitaria (176).
Vasculitis asociada a ANCA	Aumento de la formación de NETs (177).	<ul style="list-style-type: none"> • Autoanticuerpos contra proteínas de NETs (MPO y PR3) (178). • Estimulación de neutrófilos con ANCA puede inducir la NETosis (179).
Miopatías inflamatorias inmunomediadas	Formación y eliminación de NETs desregulada (probable presencia de anticuerpos séricos frente (180)).	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles elevados de NETs circulantes; formación inducida por anticuerpos específicos de la miositis (181). • Niveles de NETs asociados con actividad de la miopatía (181,182).
Síndrome antifosfolípido	Neutrófilos inflamatorios favoreciendo formación de trombos (172); presencia de NETs en circulación (183).	<ul style="list-style-type: none"> • Daño vascular debido a NETs; inhibición de degradación por anticuerpos de pacientes con SAF (184).

Tabla 2 NETs y enfermedades autoinmunes sistémicas.

La evidencia actual sugiere que en estas enfermedades una alteración en la regulación de la activación de los neutrófilos, el desequilibrio entre la formación y eliminación de las NETs, así como la presencia de los autoantígenos modificados en las mismas estarían relacionados con su aparición en sujetos predispuestos. Estas estructuras podrían tener un papel patogénico, participando en la inducción de respuestas autoinmunes y el daño a los tejidos durante la actividad de la enfermedad. Es por este motivo por el que la medición de los productos derivados de las NETs en sangre periférica podría tener utilidad. No obstante, aún hacen falta más estudios al respecto ya que la evidencia aun es escasa.

NETs en la artritis reumatoide

El interés por las NETs y la NETosis en la AR ha experimentado un creciente interés en los últimos años. Se cree que estas estructuras podrían estar implicadas en el proceso inflamatorio a nivel local en la articulación y a nivel sistémico en otros tejidos (32). Participarían tanto en la iniciación como en el mantenimiento de la enfermedad por medio de la exposición a autoantígenos (32,185,186). Se ha descrito como los neutrófilos de pacientes con AR presentan de manera espontánea una mayor formación de NETs y que esto estaría correlacionado con los niveles de ACPA (32,33).

En los tejidos de los pacientes con AR existe un ambiente proinflamatorio, debido a la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) por parte de los FLS, los macrófagos y las células dendríticas. Este ambiente inflamatorio puede activar los neutrófilos y promover su migración hacia las articulaciones inflamadas. En ellas el ambiente proinflamatorio predispone a la formación de NETs de manera exacerbada. Se ha visto como, en comparación con los neutrófilos de individuos sanos, los de los de pacientes con AR, presentan una susceptibilidad mayor a la formación de NETs. Al estimularlos exponiéndolos a sueros de pacientes con AR se induciría una mayor formación de NETs, especialmente cuando se exponen a muestras de pacientes seropositivos a título alto (tanto ACPA como FR), así como a muestras con niveles elevados de las citocinas inflamatorias TNF- α e IL-17A (32).

Los ACPA son autoanticuerpos muy específicos de la AR. Van dirigidos frente a diferentes proteínas que han sufrido modificaciones postraduccionales como la vimentina, las histonas, fibrinógeno o la α -enolasa. Pueden ser de varios subtipos y

pueden formar inmunocomplejos patogénicos en las articulaciones, favoreciendo la inflamación y la erosión ósea (187).

Los neutrófilos producen enzimas como la PAD4 y son fuente de antígenos citrulinados. La PAD es la enzima que se encarga de la citrulinación de las proteínas. En condiciones patológicas, en las que la muerte celular puede desbordar la capacidad fagocítica, las células necróticas liberan PAD al espacio extracelular, donde las mayores concentraciones de calcio permiten la citrulinación de las proteínas situadas fuera de la célula. La PAD está relacionado con la patogenia de la enfermedad, ya que, durante el estado inflamatorio, las células que sufren apoptosis o necrosis liberan proteínas que son susceptibles del efecto de este enzima(188). Las enzimas PAD pueden detectarse en la sinovial reumatoide y están presentes en las NETs en forma activa. En presencia de calcio, pueden modificar proteínas en el espacio extracelular, además de sus dianas intracelulares, creando así epítomos adicionales para la generación de ACPA (160). Estudios experimentales han mostrado que la citrulinación de las histonas a través de PAD4 es un paso fundamental en la descondensación de la cromatina, necesaria para la formación de las NETs (189).

Existe la idea de que la interacción entre las NETs y los FLS in vivo tiene resultados patogénicos. Los FLS presentes en la membrana sinovial reumatoide, pueden internalizar los productos derivados de las NETs, incluidas las proteínas citrulinadas, y mediante un aumento de la expresión de las moléculas MHC-II, presentan estos productos a los linfocitos T CD4+, estableciendo un vínculo con la respuesta inmunitaria adaptativa en la AR (190). Estudios experimentales han objetivado que se desencadenan respuestas de células T antígeno-específicas al administrar a ratones humanizados FLS cargados con NETs. Esta respuesta da lugar a la generación de ACPA y a la aparición de

daño articular similar al observado en los pacientes con AR (191). Además, se ha descrito como la EN derivada de las NETs puede alterar la estructura del cartílago y promover su citrulinación, lo que puede provocar inflamación sinovial al aumentar su inmunogenicidad y la producción de autoanticuerpos (192).

Otra de las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas y que es capaz de inducir una respuesta inmune es la carbamilación (193). En modelos animales se ha observado como, la inmunización con proteínas carbamiladas era capaz de generar quimiotaxis, activación de los linfocitos T y generación de autoanticuerpos dirigidos frente a estas proteínas (194). En el año 2011 se describió por primera vez la presencia de anti-CarP en los pacientes con AR (195). Hoy sabemos que estos anticuerpos se encuentran en el 25-50% de los pacientes, independientemente de los ACPA o el FR y que están relacionados con formas más graves de la enfermedad (196,197). Además, se han relacionado con complicaciones frecuentes de la AR como la enfermedad pulmonar intersticial (196,197), el riesgo cardiovascular (198) o la osteoporosis (199). Están relacionados con la formación de inmunocomplejos que activan la resorción ósea por los osteoclastos, lo que sugiere una relación causal con el daño óseo observado en pacientes con AR (169).

Las NETs se han sugerido como fuente de antígenos carbamilados (200). Un estudio reciente en ratones HLA-DRB1*04:01 señaló que la administración de NETs con proteínas carbamiladas estimulaba la rápida diferenciación de monocitos a osteoclastos, mediada por la señalización del TLR4 y proteínas asociadas a las NETs, incluyendo histonas y EN. Además, se encontró que las histonas carbamiladas aumentaban el número de osteoclastos y que esto se correlacionaba con la resorción ósea activa y los marcadores inflamatorios en el plasma y líquido sinovial. Estos resultados también

apuntan que las NETs desempeñan un papel directo en la erosión ósea asociada a la AR (193).

Por lo tanto, parece que las NETs representan una importante fuente de proteínas modificadas que son autoantígenos conocidos del sistema inmune, particularmente de la AR, que pueden promover respuestas inflamatorias y respuestas inmunitarias adaptativas patogénicas.

Determinación de NETs en la AR

La capacidad de detectar NETs en sangre periférica podría suponer un nuevo y potencial biomarcador complementario para pacientes AR. Sin embargo, hoy en día no existe una forma estandarizada para la determinación de las NETs. Las NETs pueden ser detectadas en fluidos como la sangre o el esputo (66).

Son estructuras muy difíciles de identificar y medir en sangre debido a que tienen una vida media corta por acción de las DNasas locales que se encargan de su degradación. Para el estudio de las NETs en sangre, se utilizan técnicas de determinación indirecta, midiendo los productos derivados de ellas como el ADN libre circulante (cfADN), o complejos ADN-productos derivados de las NETs como MPO, histonas citrulinadas (citH3) o la NE (201,202). Habitualmente se utilizan técnicas de ELISA tipo "sándwich" para su determinación en sangre periférica, preferiblemente en plasma (202). Para este método se utilizan anticuerpos específicos para identificar las proteínas asociadas con las NETs (por ejemplo, CitH3, MPO, EN). La ventaja que suponen los ensayos de ELISA es que son técnicas prácticas para la detección de NETs, ya que permiten el estudio de varias muestras a la vez. Por lo tanto, es una técnica aplicable para el estudio de grandes cohortes de pacientes (41,170,203,204). Sin embargo, la

cuantificación de los restos de las NETs es una técnica indirecta que puede dar lugar a falsos positivos o negativos, al utilizar diferentes complejos proteicos que pueden no ser específicos de los productos de la NETosis. Además, para que las NETs puedan utilizarse como herramientas de cribado, son necesarios estudios que normalicen y definan los niveles normales de los patológicos.

Valor diagnóstico de las determinaciones de NETs en sangre periférica

Existe un aumento en la concentración en sangre periférica de los productos derivados de las NETs en los pacientes con AR (31). En los últimos tiempos, varios estudios se han centrado en la identificación de las posibles vías de señalización que dan lugar al aumento de la formación de NETs en estos pacientes. Se pretende determinar si la medición de los productos derivados de la formación de NETs es útil para el diagnóstico (185).

Estudios in vitro han demostrado como en la AR existe un aumento espontáneo en la formación de NETs (30). La determinación de productos derivados de los NETs en sangre periférica, como nucleosomas libres o los complejos ADN-EN o ADN-MPO, muestra un alto valor para el diagnóstico de la AR con alta sensibilidad y especificidad (30,33). Varios estudios experimentales han encontrado que la concentración en sangre de productos derivados de las NETs es más elevada en pacientes con AR en comparación con controles sanos (31,33,88,205,206) por lo que se ha sugerido que podrían tener cierto valor diagnóstico complementario en casos donde se sospeche AR ((31) La concentración en sangre de anticuerpos dirigidos frente a los NETs parece ser significativamente más alto en la AR, especialmente en pacientes con FR positivo (34).

En consecuencia, la evidencia disponible hasta el momento sugiere que la detección cuantitativa de los productos derivados de las NETs podría ser una herramienta complementaria útil para identificar a los individuos con AR (207).

NETs como marcadores de actividad de la artritis reumatoide.

Varios estudios han evaluado en los últimos años si medir los productos derivados de las NETs en sangre periférica podría ser útil como un marcador de actividad de la enfermedad. Los resultados son contradictorios: algunos trabajos describen relación entre los niveles de NETs y la actividad de la enfermedad (31,200,205,206), mientras que, en otros, esta asociación no ha podido ser confirmada (33,208,209).

Varios estudios han analizado los niveles de los productos derivados de las NETs en sangre periférica y su relación con la actividad de la enfermedad (31,200,205,206). C. Pérez-Sánchez y sus colaboradores (31) describieron una fuerte correlación entre los complejos derivados de las NETs y la actividad de la enfermedad en pacientes con AR, evaluada mediante DAS28 y los RFA (tanto VSG como PCR); así como con marcadores de estrés oxidativo. Mediante el análisis de curvas características operativa del receptor (ROC), la concentración de las NETs permitió identificar pacientes con AR activa (31).

Estos resultados positivos se han visto también en pacientes con AR y enfermedad periodontal. Existen ciertas evidencias de una conexión entre las NETs, la enfermedad periodontal y la AR(210), debido a sus características patológicas comunes(211). Las NETs, como mecanismo antimicrobiano, podrían desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad periodontal, tanto gingivitis como en la periodontitis (212). Se ha descrito que existe una asociación entre la concentración de los remanentes de los NETs en sangre periférica y la gravedad de la enfermedad, no sólo

de la periodontitis sino también de la AR. Se ha identificado una correlación positiva entre los productos derivados de las NETs y la actividad de la AR (200,205). El tratamiento de la enfermedad periodontal consigue una disminución en los niveles de NETs y de la actividad de la AR, aunque con una relevancia clínica limitada, a pesar de su significación estadística(200,205).

Sin embargo, existen otros grupos de investigación que han reportado resultados negativos. En 2016 MK Fagerhol y sus colaboradores publicaron un innovador estudio que evaluó la utilización de un método híbrido de ELISA para medir productos derivados de las NETs en pacientes con AR y mieloma múltiple (208). Aunque sólo incluyeron 8 pacientes con AR, se encontró una correlación positiva moderada entre los niveles de remanentes de las NETs y la PCR, pero no se encontró relación con ningún otro parámetro de actividad, ni clínico ni de laboratorio (83). En un estudio transversal con 74 pacientes con AR y 50 controles sanos que evaluó la relación entre los niveles de productos derivados de las NETs en suero y diferentes índices de actividad de la enfermedad, no se observó correlación con la actividad de la AR (33). Del mismo modo, en un estudio realizado en población china tampoco encontró asociación entre los niveles de NETs y la actividad de la AR (209).

NETs y respuesta al tratamiento en la AR.

También han sido estudiadas las NETs como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con AR. Uno de los fármacos más estudiados ha sido el tocilizumab. En un primer trabajo publicado en el año 2017 por P. Ruiz-Limón y colaboradores (213) se valoraron el efecto de este anti-rIL-6 sobre los factores protrombóticos de la AR, utilizando las NETs como uno de los parámetros del estudio.

El estudio incluyó a 20 pacientes con AR activa a los que se les pautó tratamiento con tocilizumab. A los 6 meses se encontró mejoría en la actividad de la enfermedad y que ésta estaba relacionada con una reducción de los niveles de las NETs. En concordancia con este resultado, sus estudios in vitro observaron que la exposición de los neutrófilos de los pacientes a tocilizumab conseguía también una disminución de la formación de NETs, confirmando la especificidad de los efectos de esta terapia sobre la NETosis (213).

También se ha estudiado los efectos de los antagonistas del TNF. En un trabajo realizado ese mismo año por C. Pérez-Sánchez y sus colaboradores se evaluaron los efectos de infliximab y tocilizumab en la formación de las NETs (31). Encontraron que después de 6 meses de tratamiento se observaba una menor concentración de derivados de las NETs en sangre. Esto además se asociaba con una reducción paralela de la actividad de la enfermedad y de la expresión de mediadores inflamatorios. Estos resultados estaban en concordancia con los experimentos in vitro, donde encontraron que al tratar los neutrófilos con infliximab o tocilizumab previamente conseguían evitar el aumento de la extrusión de fibras de ADN observado al exponer los neutrófilos a plasma de pacientes con AR (31). En esta misma línea, se describió en el año 2020 un modelo integrativo de valoración de la enfermedad de acuerdo con cambios en parámetros serológicos relacionados con la inflamación, la NETosis, el estrés oxidativo y los microRNA después de tratamiento con anti-TNF. Se vio que los pacientes que respondían al tratamiento presentaban un descenso en los parámetros inflamatorios, incluida la concentración de las NETs (206).

Por consiguiente, parece que la determinación de los remanentes de las NETs en sangre periférica de los pacientes con AR podría tener un papel importante para evaluar la respuesta al tratamiento de la enfermedad.

Hipótesis de trabajo

Hipótesis de trabajo

Los marcadores tradicionales de fase aguda de la respuesta inflamatoria, como la VSG y la PCR, se utilizan comúnmente para evaluar la actividad de la AR. Son fundamentales para la aplicación de las estrategias TTT. Sin embargo, se cuestiona la capacidad de estos RFA para reflejar con precisión la inflamación sinovial en pacientes tratados con determinadas terapias dirigidas específicas (anti-rIL-6 o JAKi).

Se postula que los marcadores de actividad de los neutrófilos (calprotectina y NETs) reflejan de forma más precisa la actividad inflamatoria de los pacientes con AR tratados con anti-rIL-6 o JAKi, en comparación a los RFA clásicos (PCR y VSG). Se espera que esta investigación proporcione información importante sobre la utilidad de los marcadores de activación neutrofílica en la monitorización y tratamiento de los pacientes con AR en el contexto de las terapias dirigidas específicas.

Objetivos

Objetivos

Analizar la asociación que existe entre los marcadores de activación neutrofilica y la actividad inflamatoria de la enfermedad medida por criterios clínicos y ecográficos en pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi.

Objetivos *primarios*

- A. Analizar la precisión de los niveles plasmáticos de calprotectina para valorar el estado inflamatorio de la enfermedad, según criterios clínicos utilizando índices compuestos de actividad en pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi.
- B. Analizar la asociación de los niveles plasmáticos de calprotectina para discriminar el estado inflamatorio valorado por ecografía (HS, PD y puntuación ecográfica total) en pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi.
- C. Analizar la precisión de los niveles de NETs para valorar el estado inflamatorio de la enfermedad según valoración clínica e índices compuestos en pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi.
- D. Analizar la asociación de los niveles de NETs para discriminar el estado inflamatorio valorado por ecografía (HS, PD y puntuación ecográfica total) en pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi.

Objetivos *secundarios*

- A. Analizar la utilidad de la PCR ultrasensible (PCRus) y la VSG para discriminar el estado inflamatorio de la AR en paciente tratados con anti-rIL-6 o JAKi, evaluado por parámetros clínicos y ecográficos.
- B. Analizar la relación entre las NETs circulantes y el tipo de tratamiento con fármacos dirigidos.
- C. Analizar la asociación entre niveles de NETs y autoanticuerpos en suero (FR, ACPA y anti-CarP).

Material, método y resultados

Material, método y resultados

Los artículos incluidos en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

Artículo 1

Título: Plasma calprotectin as a biomarker of ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis patients receiving IL-6 antagonists or JAK inhibitors.

Revista: Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease 2022

Doi: 10.1177/1759720X221114105

Resumen:

Objetivos: Analizar la precisión de la calprotectina plasmática en pacientes AR que reciben anti-rIL-6 o JAKis en la detección de sinovitis ecográfica y compararla con los RFA [PCRus y VSG].

Métodos: Se realizó un estudio observacional transversal de pacientes con AR que recibían anti-rIL-6 (tocilizumab o sarilumab) o JAKi (baricitinib o tofacitinib). Se analizó la calprotectina plasmática para el diagnóstico de sinovitis por ecografía [grado de HS ≥ 2 y señal de PD ≥ 1] utilizando curvas ROC. También se estudió el rendimiento de la PCRus y la VSG. Se compararon las tres curvas ROC para determinar cuál tenía el mayor poder discriminatorio. Se estudiaron las asociaciones entre la calprotectina plasmática y las puntuaciones ecográficas mediante análisis de correlación.

Resultados: Se incluyeron 63 pacientes con AR. Los niveles medios de calprotectina plasmática fueron significativamente más altos en pacientes con sinovitis ecográfica que en aquellos sin sinovitis ($0,89 \pm 0,85$ vs. $0,30 \pm 0,12$ $\mu\text{g/ml}$; $p = 0,0003$). Se encontró una correlación moderada entre la calprotectina y todas las puntuaciones

ecográficas (puntuación de HS Rho = 0,479; puntuación de PD Rho = 0,492; y puntuación global Rho = 0,495). La capacidad discriminadora de la calprotectina plasmática mostró un área bajo la curva (AUC) de 0,795 (IC del 95%: 0,687-0,904). El AUC de la PCRus y la VSG fue de 0,721 y 0,564, respectivamente. Los niveles séricos de PCRus mostraron una correlación positiva baja con las tres puntuaciones ecográficas (Rho < 0,40). Después del análisis según los medicamentos administrados, la correlación desapareció en pacientes que recibían anti-rIL-6.

Conclusión: La calprotectina plasmática puede ser un biomarcador sensible de inflamación sinovial en pacientes con AR tratados con anti-rIL-6 o JAKi.

Plasma calprotectin as a biomarker of ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis patients receiving IL-6 antagonists or JAK inhibitors

Beatriz Frade-Sosa*¹, Andrés Ponce*¹, José Inciarte-Mundo, Rosa Morlà, Viginia Ruiz-Esqueda¹, Laura Macías, Ana Belen Azuaga, Julio Ramirez, Juan D. Cañete, Jordi Yague, Josep M. Auge, José A. Gomez-Puerta¹ and Raimon Sanmarti¹

Abstract

Objectives: To analyse the accuracy of plasma calprotectin in patients with rheumatoid arthritis (RA) receiving monoclonal antibodies against IL-6 receptors (anti-rIL-6) or JAK inhibitors (JAKi) in detecting ultrasound (US) synovitis and compare it with acute phase reactants [high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and ESR].

Methods: An observational cross-sectional study of RA patients receiving anti-rIL-6 (tocilizumab or sarilumab) or JAKi, (baricitinib or tofacitinib) was made. Plasma calprotectin for the diagnosis of US synovitis [synovial hypertrophy grade (SH) ≥ 2 plus power Doppler signal (PD) ≥ 1] was analysed using receiver operating characteristic curves (ROCs). The performance of ESR and hs-CRP was also studied. The three ROC curves were compared to determine which had the highest discriminatory power. Associations between plasma calprotectin and US scores were made using correlation analysis.

Results: Sixty-three RA patients were included. Mean plasma calprotectin levels were significantly higher in patients with US synovitis than in those without (0.89 ± 0.85 vs 0.30 ± 0.12 $\mu\text{g/ml}$; $p = 0.0003$). A moderate correlation between calprotectin and all US scores (HS score $\text{Rho} = 0.479$; PD score $\text{Rho} = 0.492$; and global score $\text{Rho} = 0.495$) was found. The discriminatory capacity of plasma calprotectin showed an AUC of 0.795 [95% CI: 0.687–0.904]. The AUC of hs-CRP and ESR was 0.721 and 0.564, respectively. hs-CRP serum levels showed a low positive correlation with the three US scores ($\text{Rho} < 0.40$). After analysis according to the drugs administered, the correlation disappeared in patients receiving anti-rIL-6.

Conclusion: Plasma calprotectin may be a sensitive biomarker of synovial inflammation in RA patients treated with anti-rIL-6 or JAKi.

Keywords: acute phase proteins, biomarkers, leukocyte L1 antigen complex (calprotectin), rheumatoid arthritis, ultrasonography

Received: 17 January 2022; revised manuscript accepted: 29 June 2022.

Introduction

The prognosis of rheumatoid arthritis (RA) has significantly improved in recent decades. In patients who do not achieve the therapeutic goal (remission or low disease activity) with a first strategy using conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), e.g.

methotrexate, a second strategy using targeted therapies, biologics, or selective Janus kinase inhibitors (JAKi) is recommended.¹ Monoclonal antibodies against interleukin (IL)-6 receptors (anti-rIL-6) (tocilizumab and sarilumab) and JAKi (tofacitinib, baricitinib and, more recently, upadacitinib) are included in this strategy, with

Ther Adv Musculoskelet Dis

2022, Vol. 14: 1–11

DOI: 10.1177/
1759720X221114105

© The Author(s), 2022.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Correspondence to:

Raimon Sanmarti
Department of
Rheumatology, Hospital
Clínic de Barcelona, Carrer
Villarroel 170, Barcelona
08170, Spain.
sanmarti@clinic.cat

Beatriz Frade-Sosa
Andrés Ponce
Rosa Morlà
Viginia Ruiz-Esqueda
Ana Belen Azuaga
Julio Ramirez
Juan D. Cañete

José A. Gomez-Puerta
Department of
Rheumatology, Hospital
Clínic de Barcelona,
Barcelona, Spain

José Inciarte-Mundo
Fundació Clínic per a
la Recerca Biomèdica,
Barcelona, Spain

Laura Macías
Josep M. Auge
Biochemistry and
Molecular Genetics
Department, Hospital
Clínic de Barcelona,
Barcelona, Spain

Jordi Yague
Department of
Immunology, Hospital
Clínic – CDB, Barcelona,
Spain

*Beatriz Frade-Sosa and
Andres Ponce contributed
equally.

journals.sagepub.com/home/tab



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

significant improvements in clinical and radiographic outcomes.^{2,3} It has been shown that both families of targeted therapies have a profound impact on the acute phase response, including C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR), due to inhibition of hepatocyte stimuli *via* IL-6.^{4,5} Acute phase reactants (APRs) form part of the composite activity indices [e.g. Disease Activity Score (DAS) and Simplified Disease Activity Index (SDAI)] used to measure inflammatory activity in RA and may lead to an overestimate of the clinical response when using these targeted drugs.⁶

Calprotectin is a heterodimeric complex of two S100 calcium-binding myeloid-related proteins (MRP8 [or S100A8] and MRP14 [or S100A9]) which is released from cells of the innate immunity, such as neutrophils or monocytes, which have proinflammatory activities and act as endogenous-associated molecular patterns *via* Toll-like receptor activation.⁷ Calprotectin is strongly expressed in rheumatoid synovial membrane.⁸ Recently, serum and plasma calprotectin have been found to be sensitive markers of inflammatory activity in RA patients⁹ and have been associated with radiographic damage,¹⁰ as a biomarker of clinical response to antirheumatic drugs¹¹ and as a predictive factor for disease relapse.¹²

Joint ultrasound (US) is a validated imaging technique for synovitis evaluation in RA, with a higher sensitivity than the clinical examination in detecting active synovitis.¹³ A significant proportion of patients in clinical remission may exhibit active synovitis on US.¹⁴ Recent studies have shown that calprotectin is more associated closely than APR with US synovitis in RA, even in patients in remission or with low disease activity.^{15,16}

We have shown that in RA patients treated with tocilizumab, serum calprotectin but not serum CRP correlates with disease activity,¹⁷ a finding also observed by other authors.¹⁸ To our knowledge, there are no studies on calprotectin as a biomarker of US synovitis in RA patients treated with anti-rIL-6 or JAKi. The objective of the study was to analyse the accuracy of plasma calprotectin in patients with RA receiving anti-rIL-6 or JAKi in detecting US synovitis and compare it with traditional APR (CRP and ESR). We hypothesized that calprotectin has a higher discriminatory capacity than APR in detecting US synovitis in these patients.

Methods

Design and study population

An observational cross-sectional study of RA patients (ACR/EULAR 2010 criteria)¹⁹ from our arthritis unit receiving anti-IL-6 receptor monoclonal antibodies (tocilizumab or sarilumab) or JAKi (baricitinib or tofacitinib) for ≥ 3 months who were consecutively included. Patients were included on the day of the scheduled routine follow-up visit from September 2020 to September 2021. Patients were included regardless of disease activity status, previous DMARDs (including biological therapies or JAKi), and concomitant treatment (methotrexate or others). Patients who, at the study visit presented signs of active infection or other clinical conditions that, in the opinion of the investigator, could modify the results of CRP, ESR, or calprotectin determinations were excluded. Demographic data, disease duration, autoantibody status (ACPA/RF), radiological data (erosive disease), previous biologic therapy, and concomitant therapy were collected.

Measurement of clinical disease activity

All patients underwent a clinical assessment, including 28 swollen and tender joint counts (28-SJC and 28-TJC) and physician and patient global assessment (PhGA and PGA) with visual analogue scales (0–100 mm). Disease activity indices were subsequently calculated (DAS28, SDAI, and CDAI). In addition, participants also were asked to complete two questionnaires: the Health Assessment Questionnaire (HAQ) and the Routine Assessment of Patient Index Data 3 (Rapidx3).

Assessment of blood biomarkers

Blood samples were obtained in the clinical evaluation. ESR was measured using the Westergren method (NV < 20 mm/h), and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) using an immunoturbidimetric method measured by Siemens Atellica® Solution (lowest detection limit of 0.02 mg/dl; NV < 0.4 mg/dl). Calprotectin plasma levels were determined using an ELISA Test Kit [CALPROLAB ALP (CALPRO), Menarini Diagnósticos S.A.] according to the manufacturer's protocol. Briefly, 100 μ l of each standard, control, and diluted 1:20 sample in duplicate wells were incubated at room temperature for 40 min; three washings were made, 100 μ l of the conjugated enzyme was added, and plates were incubated at room temperature for 40 min. After

three washes and the addition of the enzyme-substrate, the optical density values at 405 nm were determined using an ELISA reader. To reduce variations in calprotectin determination, the whole procedure was performed in a Triturus autoanalyzer; the coefficients of variation were 5% within and 13% between assays.

Imaging biomarkers: US score. Sonographic assessments were carried out using high-sensitivity US equipment (MyLab9[®]; Esaote, Genoa, Italy), with a longitudinal probe, frequency range from 10 to 14 MHz and a pulse repetition frequency between 800 and 900 Hz. Joint musculoskeletal US findings were defined according to published Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trial (OMERACT) definitions.²⁰

A single experienced sonographer (AP), who was blinded to the results of the clinical joint examination, evaluated 11 joints and tendons of each hand (including the proximal interphalangeal joints, metacarpophalangeal joints, and wrists) for synovial hypertrophy (SH) and intra-articular power Doppler (PD) signalling according to EULAR guidelines.²¹ SH and PD signals were graded using a four-grade semi-quantitative scoring system (0 = no, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe) according to the methodology of Szkudlarek *et al.*²² The highest SH and PD grade detected during the scans was adopted as representative of each joint, respectively. We also evaluated synovitis in symptomatic joints outside the hands and graded it using the methodology of Szkudlarek *et al.*²²

By summing the scores for elementary lesions in each joint, we calculated the PD score (sum of PD scores in all joints, range 0–66), the SH score (sum of SH scores in all joints, range 0–66) and the global score (sum of the PD and SH scores, range 0–132). The score does not include joints outside the hands. To ensure a stringent definition of US synovitis, only patients with SH grade ≥ 2 plus PD signal (≥ 1) were classified as having active synovitis.²³

Statistical analysis. Continuous data were presented as the mean (SD) and categorical variables as absolute frequencies with percentages. Groups were compared using parametric or nonparametric tests according to the distribution of the variables.

The performance of calprotectin in the diagnosis of US synovitis was analysed using receiver operating characteristic curves (ROC) with US

synovitis yes/no (yes: SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1) as the gold standard. The ROC curves made it possible to identify the best cut-off point in terms of sensitivity, specificity, and likelihood ratios, and to calculate the area under the curve (AUC) as a measure of the overall discriminative power. The performance of ESR and hs-CRP was also studied, and the three ROC curves were compared to determine which of the three parameters had the highest discriminatory power for the diagnosis of synovitis.

Correlation analysis (Spearman's correlation coefficient) was used to assess the association between plasma calprotectin and US scores (PD score, SH score, and global score). The analysis was made using STATA version 12 (STATA Corp, College Station, TX, USA).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Reg. HCB20210783). Written informed consent was obtained from all patients before study enrolment and patients were de-identified. The reporting of this study conforms to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement.²⁴

No specific funding was received from any bodies in the public, commercial, or not-for-profit sectors to carry out the work described in this article.

Results

Demographic, clinical, and therapeutic characteristics

Although the initial sample consisted of 78 patients, US studies were performed in 63 (42 receiving anti-rIL-6 and 21 JAKi), which was the final sample included in the study. Ninety-two percent of patients were female with a mean age of 56 (± 12) years. Mean disease duration was 15 (± 8.9) years, 90.5% were seropositive (RF and/or ACPA) and 75.8% had erosive disease. In general, disease activity was low, with a median CDAI value of 11.3 (± 8.7). DAS28 remission was observed in 29 patients (46%). The mean duration of drug therapy (anti-rIL-6 or JAKi) was 45 (± 42.4) months.

Patient with US synovitis had a significantly higher prevalence of radiographic erosive disease

and a trend to a higher disease duration. As expected, higher median values of the disease activity composite index were observed in patients with US synovitis than in those without, although the difference was not significant measured by DAS28. Furthermore, remission rates were higher in patients without US synovitis. No differences were observed according to the drugs used (anti-rIL-6 or JAKi; Table 1).

Calprotectin and APR as biomarkers of US synovitis

Mean plasma calprotectin levels were significantly higher in patients with US synovitis than in those without (0.89 ± 0.85 vs 0.30 ± 0.12 $\mu\text{g/ml}$; $p=0.0003$), as occurred with hs-CRP serum levels (0.05 ± 0.08 vs 0.27 ± 0.41 mg/dL ; $p=0.007$) but not with ESR (16.9 ± 25.6 vs 7.8 ± 4.2 $p=0.474$; Table 1 and Figure 1).

Analysis of the correlation between blood biomarkers and US scores showed a moderate correlation between calprotectin and the three US scores (HS score $\text{Rho} = 0.479$; PD score $\text{Rho} = 0.492$; and global score $\text{Rho} = 0.495$). The association of calprotectin with these three US parameters was found in patients treated with anti-rIL-6 and JAKi, although the magnitude of the association was greater in patients treated with JAKi (Table 2).

hs-CRP serum levels also showed a correlation with the three US scores, although with a low positive correlation ($\text{Rho} < 0.40$). However, analysis of the correlation according to treatment showed that the correlation disappeared in patients receiving anti-rIL-6 (Table 2). ESR showed a good correlation with US scores in patients receiving JAKi but not in those treated with anti-rIL-6 (Table 2).

Plasma calprotectin had a very good discriminatory capacity, with an AUC of 0.795 [95% confidence interval (CI): 0.687–0.904]. The best cut-off was ≥ 0.38 , with a sensitivity of 67.4% and a specificity of 88.2%, which correctly classified 73% of patients with US synovitis. The positive likelihood ratio was 5.7. The discriminatory capacity of hs-CRP and ESR was lower, with an AUC of 0.721 and 0.564, respectively (Figure 2). The ability of plasma calprotectin to discriminate US synovitis was higher in patients treated with JAKi (AUC = 0.931, 95% CI: 0.820–1.000) than in those receiving anti-rIL-6 (AUC = 0.712; 95% CI: 0.558–0.867; Figure 2). hs-CRP and ESR had a good discriminatory capacity to detect US synovitis in patients treated with JAKi but not in those receiving anti-rIL-6 (Figure 3).

When analysing the correlation between CDAI index and US score, we have found a lower correlation than that observed with calprotectin

Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of patients with RA (N=63). Demographic, clinical and treatment variables, and biomarkers of patients classifying according to ultrasound activity [ultrasound synovitis in ≥ 1 joint (SH ≥ 2 + PD ≥ 1)].

	Total (n=63)	No US synovitis (n=17)	With US synovitis (n=46)	P value
Age, years (mean \pm SD)	55.9 \pm 11.8	51.9 \pm 12.5	57.4 \pm 11.3	0.159
Disease duration, years (mean \pm SD)	15.0 \pm 8.9	11.1 \pm 6.0	16.5 \pm 9.4	0.051
Female, n (%)	58 (92.1%)	16 (94.1%)	42 (91.3%)	0.590
Seropositive (RF/ACPA), n (%)	57 (90.5%)	15 (88.2%)	42 (91.3%)	0.657
Erosions, n (%)	47 (75.8%)	9 (56.2%)	38 (82.6%)	0.034
Extraarticular manifestations, n (%)	22 (34.9%)	4 (23.5%)	18 (39.1%)	0.373
Concomitant sDMARDs, n (%)	29 (48.3%)	8 (50.0%)	21 (47.7%)	0.876
Concomitant glucocorticoids, n (%)	29 (46.0%)	7 (41.2%)	22 (47.8%)	0.638

(Continued)

Table 1. (Continued)

	Total (n = 63)	No US synovitis (n = 17)	With US synovitis (n = 46)	P value
Prednisone dose (mg/day), (mean ± SD)	4.2 ± 2.4	4.3 ± 1.2	4.1 ± 2.7	0.451
Treatment group				0.688
• IL-6 inhibitor (anti-rIL-6)	42 (66.7%)	12 (70.6%)	30 (65.2%)	
• JAK inhibitor (JAKi)	21 (33.3%)	5 (29.4%)	16 (34.8%)	
Targeted (anti-rIL-6 or JAKi) treatment duration, (mean ± SD) month	45.9 ± 42.4	48.8 ± 46.8	44.8 ± 41.2	0.846
Laboratory				
Glomerular filtration rate; ml/min (mean ± SD)	82.88 (12.20)	86.18 (5.87)	83.20 (11.99)	0.331
Plasma calprotectin (µg/mL)	0.73 ± 0.78	0.30 ± 0.12	0.89 ± 0.85	0.0003
ESR mm (mean ± SD)	14.4 ± 22.3	7.8 ± 4.2	16.9 ± 25.6	0.474
hs-CRP (mean ± SD) mg/dL	0.21 ± 0.36	0.05 ± 0.08	0.27 ± 0.41	0.007
Disease Activity				
28 SJC (mean ± SD)	3.7 ± 5.4	2.8 ± 4.1	4.1 ± 5.8	0.442
28 TJC (mean ± SD)	1.4 ± 1.9	0.1 ± 0.3	1.9 ± 2.1	<0.0001
PGA (mean ± SD)	3.6 ± 2.1	3.4 ± 2.4	3.7 ± 2.0	0.408
PhGA (mean ± SD)	2.6 ± 1.8	1.3 ± 1.3	3.0 ± 1.7	0.0003
VAS pain (mean ± SD)	3.8 ± 2.4	3.5 ± 2.6	3.9 ± 2.4	0.508
DAS28 (mean ± SD)	3.0 ± 1.3	2.5 ± 1.1	3.2 ± 1.4	0.070
• Remission, n (%) ^a	29 (46.03)	11 (64.71)	18 (39.13)	
• Low disease activity ^b , n (%)	8 (12.70)	1 (5.88)	7 (15.22)	
• Moderate disease activity ^c , n (%)	24 (38.10)	5 (29.41)	19 (41.30)	
• High disease activity ^d , n (%)	2 (3.17)	0	2 (4.35)	
CDAI (mean ± SD)	11.3 ± 8.7	7.6 ± 6.6	12.6 ± 9.0	0.026
SDAI (mean ± SD)	11.8 ± 8.8	8.0 ± 6.6	13.2 ± 9.2	0.026
RAPID3 (mean ± SD)	9.2 ± 5.7	8.8 ± 6.9	9.3 ± 5.2	0.448
HAQ (mean ± SD)	0.94 ± 0.71	0.82 ± 0.81	0.99 ± 0.67	0.277
CDAI, Clinical Disease Activity Index; DAS28, Disease Activity Score; HAQ, Health Assessment Questionnaire; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PGA, patient global assessment, PhGA, global assessment; Rapid3, Routine Assessment of Patient Index Data 3; SD, standard deviation; SDAI, simplified Disease Activity Index; 28 SJC, 28 swollen joint counts; 28 TJC tender joint count; US synovitis, ultrasound synovitis; VAS pain, Visual Analogue Scale. ^a Remission: DAS28 ≤ 2.6. ^b Low disease activity: 2.6–3.2. ^c Moderate disease activity: DAS28 3.2–5.1. ^d High disease activity: DAS28 ≥ 5.1.				

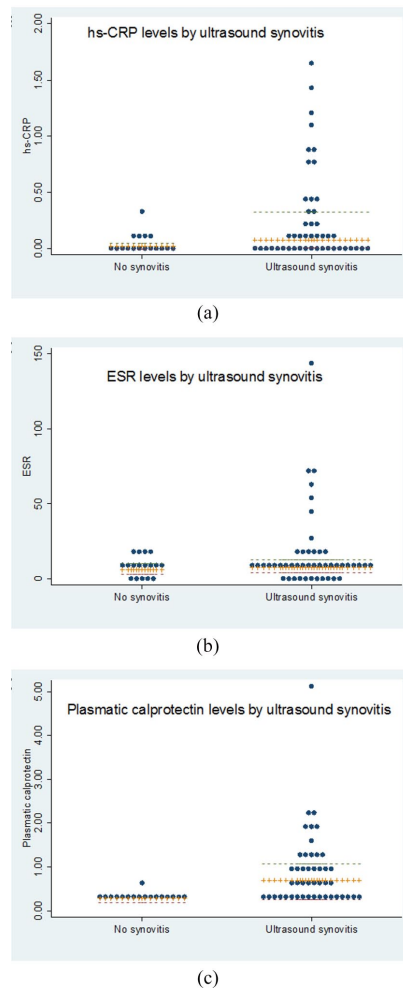


Figure 1. Blood biomarkers classifying patients according to ultrasound synovitis [ultrasound synovitis in ≥ 1 joint (SH ≥ 2 + PD ≥ 1)]: (a) hs-CRP levels according to ultrasound synovitis, (b) ESR levels according to ultrasound synovitis, and (c) plasma calprotectin levels according to ultrasound synovitis. The central line (orange) represents the median. The lateral lines the 25th (red) and 75th (green) percentiles.

(correlation between CDAI and US scores: CDAI and HS score $Rho = 0.298$; CDAI and PD score

$Rho = 0.354$; CDAI and global score $Rho = 0.334$, p value < 0.05).

Discussion

We evaluated the accuracy of plasma calprotectin in detecting US synovitis in patients with RA treated with anti-rIL-6 or JAKi. Our results show that plasma calprotectin levels are associated with US synovitis in these patients. Calprotectin demonstrated a higher capacity than traditional biomarkers, such as CRP or ESR, in detecting US synovitis in RA patients treated with anti-rIL-6 and a better correlation with US scores in patients receiving JAKi. Therefore, plasma calprotectin may be considered a sensitive biomarker of synovial inflammation in RA patients treated with anti-rIL-6 or JAKi.

The role of APR in the evaluation of disease activity in RA has been questioned in patients receiving anti-rIL-6, such as tocilizumab and sarilumab, both of which have an important effect on APR due to the reduction in hepatic synthesis of acute phase proteins due to the inhibition of IL6 stimuli.^{6,25} As demonstrated with tocilizumab, CRP serum levels decrease dramatically independently of the improvement in inflammatory activity, while there are detectable drug levels in the blood.²⁶ Therefore, CRP serum levels should not be used as a biomarker of inflammation in patients treated with anti-rIL-6 and the composite indices including APR, such as DAS28, should be avoided. Furthermore, significant residual synovial inflammation, even in patients in clinical remission using lower cut-off values than previously validated, has been demonstrated in patients receiving tocilizumab.²⁷

Calprotectin may be a sensitive biomarker of synovitis in RA patients treated with anti-rIL-6, due to the high levels observed in the blood, which reflect local synovial inflammation rather than a systemic effect as occurs with APR.²⁸ Recent studies have shown that calprotectin is increased in the serum or plasma of patients with RA and other immunodetected diseases, reflecting a relevant role of neutrophilic activation in these diseases.²⁹ Calprotectin correlates better with active inflammatory active disease in RA than traditional APR such as CRP and ESR.³⁰

To our knowledge, this is the first study to evaluate the performance of blood calprotectin in RA patients treated with JAKi, a family of targeted

Table 2. Correlation between ultrasound synovitis scores and blood biomarkers.

	SH score (Rho; p value)	PD score (Rho; p value)	Global score (Rho; p value)
Plasma calprotectin	0.479 ($p=0.0001$)	0.492 ($p<0.0001$)	0.495 ($p<0.0001$)
Plasma calprotectin in IL-6 inhibitor group	0.391 ($p=0.010$)	0.349 ($p=0.023$)	0.383 ($p=0.012$)
Plasma calprotectin in JAKi group	0.630 ($p=0.002$)	0.703 ($p=0.0004$)	0.700 ($p=0.0004$)
hs-CRP	0.300 ($p=0.017$)	0.280 ($p=0.026$)	0.301 ($p=0.016$)
hs-CRP in IL-6 inhibitor group	0.166 ($p=0.294$)	0.085 ($p=0.594$)	0.147 ($p=0.352$)
hs-CRP in JAKi group	0.401 ($p=0.071$)	0.544 ($p=0.011$)	0.533 ($p=0.013$)
ESR	0.220 ($p=0.083$)	0.105 ($p=0.412$)	0.176 ($p=0.168$)
ESR in IL-6 inhibitor group	0.049 ($p=0.757$)	-0.068 ($p=0.668$)	0.020 ($p=0.895$)
ESR in JAKi group	0.711 ($p=0.0003$)	0.659 ($p=0.0012$)	0.692 ($p=0.0005$)

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin; JAKi, Janus kinase inhibitor; PD, power Doppler; SH, synovial hypertrophy.

therapies that also have also an important impact on APR.³ Our results show that, in patients treated with JAKi, plasma calprotectin has a higher correlation with US synovitis than hs-CRP. Also, this correlation is higher than those observed with a clinical activity index such as CDAI. The discriminatory capacity of calprotectin in detecting US synovitis was also very high, but similar to that observed with hs-CRP. By contrast, hs-CRP and ESR did not show the same relevance in patients treated with anti-rIL-6, where only calprotectin was a biomarker of US synovitis.

US is a sensitive imaging technique for the detection of active synovitis in patients with RA and other immune-mediated rheumatic conditions. Our results confirm the association of calprotectin with US synovitis in RA as documented in other studies.^{15,16,31,32} We have previously demonstrated that, in patients receiving tumour necrosis factor inhibitor (TNFi), calprotectin is a good biomarker of US synovitis, even in patients in remission or with low disease activity.¹⁶ We have replicated these findings for the first time in RA patients treated with anti-rIL-6 and JAKi, most of whom were in remission or with low disease activity.

Our study has some limitations. We included a relatively small sample size, especially of patients treated with JAKi. On the contrary, patients were predominantly in remission or with low disease

activity. However, even in this context, calprotectin showed a good discriminatory capacity for US synovitis. No attempt was made to further distinguish the different antirheumatic drugs, to avoid very small samples that would make data interpretation difficult. However, we cannot say whether differences might be observed within the same therapeutic group.

In conclusion, plasma calprotectin is a good biomarker of US synovitis in patients with RA treated with anti-rIL-6, whereas traditional APR (CRP or ESR) do not reflect local synovial inflammation detected by US. Some differences emerged in RA patients treated with JAKi, where calprotectin is

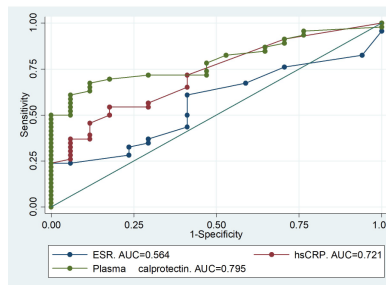


Figure 2. ROC curves of blood biomarkers for ultrasound synovitis. hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

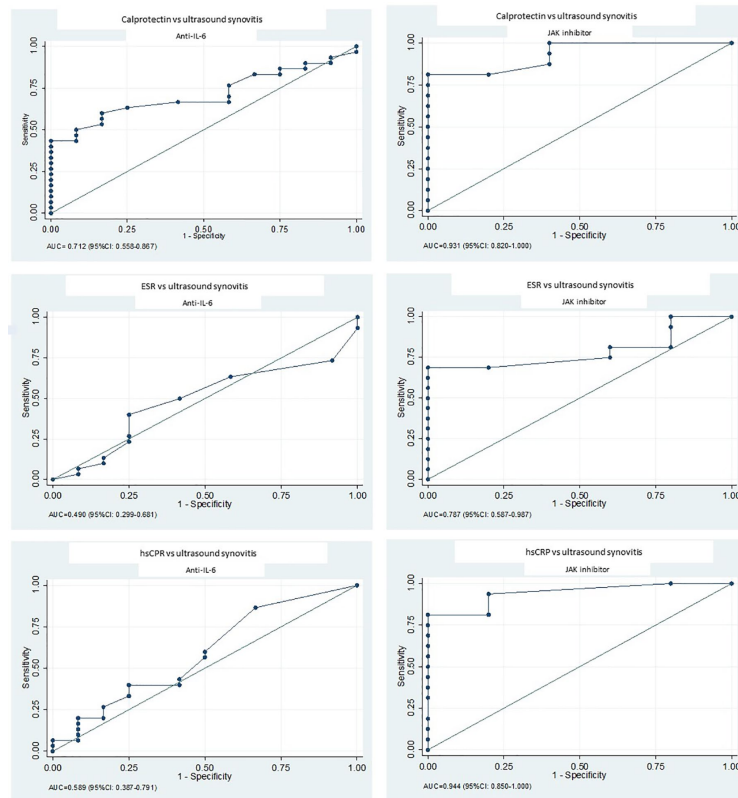


Figure 3. ROC curves of calprotectin, hs-CRP And ESR vs ultrasound synovitis according to type of treatment. hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

also a good biomarker of US synovitis in RA and in whom APR also reflect synovial inflammation. We suggest that plasma calprotectin is a valuable biomarker of synovitis in these patients.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona. Informed consent was obtained from all patients before study enrolment

Consent for publication

Not applicable.

Author contributions

Beatriz Frade-Sosa: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Andrés Ponce: Data curation; Investigation; Methodology; Project administration; Writing – original draft; Writing – review & editing

Jose Inciarte-Mundo: Investigation; Writing – review & editing.

Rosa Morlà: Writing – review & editing.

Viginia Ruiz-Esquide: Conceptualization; Writing – review & editing.

Laura Macías: Conceptualization; Investigation.

Ana Belen Azuaga: Investigation; Writing – review & editing.

Julio Ramirez: Writing – review & editing.

Juan D. Cañete: Conceptualization; Writing – review & editing.

Jordi Yague: Investigation; Writing – review & editing.

Josep M. Auge: Conceptualization; Investigation; Writing – review & editing.

Jose A. Gomez-Puerta: Investigation; Methodology; Writing – review & editing.

Raimon Sanmarti: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Validation; Visualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Acknowledgements

The authors acknowledge the assistance provided by rheumatology unit nurses (Nuria Sapena and Marta Bassas) statistical help from M Jesus Garcia Yebenes (Inmusc) and technical advice from David Buss.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Competing interests

BFS received support for attending meetings from Pfizer, AbbVie, Lilly, and GSK. JIM received fees from Pfizer, AbbVie, Roche, UCB, Lilly, BMS, and MSD for research grant, consultation, and/or speaker; and is an AbbVie employee. LM received support for attending meetings and/or travel from Diasorin in 19 October (LabClin Congress). JAGP received speaker honoraria from AbbVie, BMS, Galápagos, GSK, Lilly, Pfizer, Sanofi, and Roche. RS received speaker honoraria and/or investigation grants from AbbVie, BMS, Gebro-Pharma, Lilly, MSD, Pfizer, Sanofi, and Roche. The remaining authors declare they have no conflicts of interest. No

pharmaceutical companies have participated or influenced the development of this manuscript

Availability of data and materials

Not applicable.

ORCID iDs

Beatriz Frade-Sosa  <https://orcid.org/0000-0002-5867-8434>

Andrés Ponce  <https://orcid.org/0000-0003-3068-5752>

Viginia Ruiz-Esquide  <https://orcid.org/0000-0002-2657-6601>

José A. Gomez-Puerta  <https://orcid.org/0000-0001-8177-702X>

Raimon Sanmarti  <https://orcid.org/0000-0002-8864-3806>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 685–699.
2. Navarro G, Taroumian S, Barroso N, *et al.* Tocilizumab in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums. *Semin Arthritis Rheum* 2014; 43: 458–469.
3. Taylor PC. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2019; 58(Suppl. 1): i17–i26.
4. Naka T, Nishimoto N and Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl. 3): S233–S242.
5. Asai S, Takahashi N, Kobayakawa T, *et al.* Comparison of the effects of baricitinib and tocilizumab on disease activity in patients with rheumatoid arthritis: a propensity score matching analysis. *Clin Rheumatol* 2021; 40: 3143–3151.
6. Smolen JS and Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 43–52.

7. Austermann J, Spiekermann C and Roth J. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2018; 14: 528–541.
8. Youssef P, Roth J, Frosch M, *et al.* Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 1999; 26: 2523–2528.
9. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, *et al.* Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1093–1097.
10. Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW, *et al.* Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 150–154.
11. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, *et al.* MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 499–505.
12. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, *et al.* Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2018; 20: 275.
13. Joshua F, Edmonds J and Lassere M. Power Doppler ultrasound in musculoskeletal disease: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36: 99–108.
14. Brown AK, Quinn MA, Karim Z, *et al.* Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3761–3773.
15. Hammer H, Fagerhol MK, Wien T, *et al.* The soluble biomarker calprotectin (a S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R178.
16. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, *et al.* Calprotectin and TNF trough serum levels identify power Doppler ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients in remission or with low disease activity. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 160.
17. Inciarte-Mundo J, Ruiz-Esquide V, Hernández MV, *et al.* Calprotectin more accurately discriminates the disease status of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab than acute phase reactants. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54: 2239–2243.
18. Jarlborg M, Courvoisier DS, Lamacchia C, *et al.* Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 2020; 622: 105.
19. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1580–1588.
20. Backhaus M, Burmester GR, Gerber T, *et al.* Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 641–649.
21. Wakefield RJ, Balint PV, Szkudlarek M, *et al.* Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *J Rheumatol* 2005; 32: 2485–2487.
22. Szkudlarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, *et al.* Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 955–962.
23. Ramirez J, Ruiz-Esquide V, Pomés I, *et al.* Patients with rheumatoid arthritis in clinical remission and ultrasound-defined active synovitis exhibit higher disease activity and increased serum levels of angiogenic biomarkers. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: 1–10.
24. von Elm E, Altman DG, Egger M, *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Ann Intern Med* 2007; 147: 573–577. Erratum in: *Ann Intern Med* 2008; 148: 168.
25. Burmester GR, Bykerk VP, Buch MH, *et al.* Sarilumab monotherapy versus sarilumab and methotrexate combination therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2021; 11: keab676.
26. Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, *et al.* Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheumatol* 2003; 30: 1426–1435.
27. Schoels M, Alasti F, Smolen JS, *et al.* Evaluation of newly proposed remission cut-points for Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) in rheumatoid arthritis patients upon IL-6 pathway inhibition. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 155.

28. Donato R, Cannon BR, Sorci G, *et al.* Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13: 24–57.
29. Romand X, Bernardy C, Nguyen MVC, *et al.* Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases. *Joint Bone Spine* 2019; 86: 691–698.
30. Inciarte-Mundo J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, *et al.* Serum calprotectin versus acute-phase reactants in the discrimination of inflammatory disease activity in rheumatoid arthritis patients receiving tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Care Res* 2016; 68: 899–906.
31. Nordal HH, Brokstad KA, Solheim M, *et al.* Calprotectin (S100A8/A9) has the strongest association with ultrasound-detected synovitis and predicts response to biologic treatment: results from a longitudinal study of patients with established rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 3.
32. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, *et al.* Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 252.

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

 SAGE journals

Artículo 2

Título: Neutrophilic activity biomarkers (plasma neutrophil extracellular traps and calprotectin) in established patients with rheumatoid arthritis receiving biological or JAK inhibitors: a clinical and ultrasonographic study.

Revista: Rheumatology and therapy 2024

Doi: 10.1007/s40744-024-00650-9

Resumen:

Introducción: Este estudio evalúa la precisión de los marcadores de activación de los neutrófilos, incluidas las NETs y la calprotectina, como biomarcadores de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR establecida tratados con anti-IL-6 o JAKi. También analizamos la relación entre las NET y varios tipos de terapias, así como su asociación con la autoinmunidad (FR, ACPA y anti-CarP).

Métodos: Estudio observacional transversal en el que se incluyeron pacientes con AR que recibieron tratamiento con anti-IL-6 o JAKi durante al menos 3 meses. Se incluyó un grupo control de pacientes con anti-TNF. Además, para el estudio de las NETs incluimos otros dos grupos: un grupo control positivo (pacientes con alta actividad de la enfermedad (al menos 4 articulaciones inflamadas) y un grupo control negativo (sujetos sanos). Los niveles de calprotectina en plasma se midieron utilizando un kit de ELISA y las NETs mediante la medición de sus restos en plasma (complejos de EN-ADN e citH3-ADN). También evaluamos la actividad clínica de la enfermedad, los hallazgos ecográficos y el estado de los autoanticuerpos (FR, ACPA y anti-CarP). Se buscaron asociaciones entre los biomarcadores de los neutrófilos y las puntuaciones clínicas y

ecográficas mediante análisis de correlación. La capacidad discriminadora de ambos marcadores de neutrófilos para detectar sinovitis ecográfica se analizó a través de curvas ROC.

Resultados: Se incluyeron 114 pacientes. Dos grupos de control para comparar los niveles de NET: el grupo de control activo consistió en 15 pacientes y un segundo grupo de control de 30 sujetos sanos. Los niveles de NETs en plasma no se correlacionaron con el estado clínico de la enfermedad, independientemente del índice clínico analizado o la terapia biológica administrada. No se observó correlación significativa entre los restos de NET y la sinovitis ecográfica. No hubo correlación entre NETs en plasma y autoanticuerpos. Por el contrario, la calprotectina en plasma se correlacionó positivamente con los parámetros clínicos (NAI $\rho=0.49$; $p<0.001$, CDAI $\rho=0.30$; $p<0.001$) y los parámetros ecográficos ($\rho>0.50$; $p<0.001$). Esta correlación fue más fuerte que la observada con los RFA PCRus y VSG.

Conclusión: La formación de NETs inducida por neutrófilos puede desempeñar un papel en la patogénesis de la AR, pero nuestro estudio cuestiona la utilidad de los restos de NETs en la circulación periférica como biomarcador de la actividad inflamatoria. Por el contrario, este estudio respalda firmemente la utilidad de la calprotectina como biomarcador de la actividad inflamatoria en pacientes con AR.



ORIGINAL RESEARCH

Neutrophilic Activity Biomarkers (Plasma Neutrophil Extracellular Traps and Calprotectin) in Established Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biological or JAK Inhibitors: A Clinical and Ultrasonographic Study

Beatriz Frade-Sosa · Andrés Ponce · Estibaliz Ruiz-Ortiz · Noemí De Moner · María J. Gómara · Ana Belén Azuaga · Juan C. Sarmiento-Monroy · Rosa Morlà · Virginia Ruiz-Esquide · Laura Macías · Nuria Sapena · Lola Tobalina · Julio Ramirez · Juan D. Cañete · Jordi Yague · Josep M. Auge · José A. Gomez-Puerta · Odette Viñas · Isabel Haro · Raimon Sanmarti

Received: November 15, 2023 / Accepted: February 6, 2024 / Published online: March 2, 2024
© The Author(s) 2024

ABSTRACT

Introduction: This study assesses the accuracy of neutrophil activation markers, including neutrophil extracellular traps (NETs) and calprotectin, as biomarkers of disease activity in patients with established rheumatoid arthritis (RA). We also analyse the relationship between

NETs and various types of therapies as well as their association with autoimmunity.

Methods: Observational cross-sectional study of patients with RA receiving treatment with biological disease-modifying antirheumatic drugs or Janus kinase inhibitors (JAK-inhibitors) for at least 3 months. Plasma calprotectin levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay test kit and NETs by measuring their remnants in plasma (neutrophil elastase-DNA and histone-DNA complexes). We also assessed clinical disease activity, joint ultrasound findings and autoantibody status [rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs) and anti-carbamylated protein (anti-CarP)]. Associations between neutrophilic biomarkers and clinical or ultrasound scores were sought using correlation analysis. The

Prior Presentation Frade-Sosa B, Ponce Fernandez A, Ruiz-Ortiz E, et al. AB0317 Plasma nets levels in established rheumatoid arthritis patients receiving biological or jak inhibitor therapy and association with disease activity. Annals of the Rheumatic Diseases 2023; 82:1342-1343.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40744-024-00650-9>.

B. Frade-Sosa · A. Ponce · A. B. Azuaga · J. C. Sarmiento-Monroy · R. Morlà · V. Ruiz-Esquide · N. Sapena · L. Tobalina · J. Ramirez · J. D. Cañete · J. A. Gomez-Puerta · R. Sanmarti (✉)
Department of Rheumatology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, IDIBAPS, Carrer Villarroel 170, 08170 Barcelona, Spain
e-mail: sanmarti@clinic.cat

E. Ruiz-Ortiz · N. De Moner · J. Yague · O. Viñas
Department of Immunology-CDB, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Barcelona, Spain

M. J. Gómara · I. Haro
Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, Institute for Advanced Chemistry of Catalonia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain

L. Macías · J. M. Auge
Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain

discriminatory capacity of both neutrophilic biomarkers to detect ultrasound synovitis was analysed through receiver-operating characteristic (ROC) curves.

Results: One hundred fourteen patients were included. Two control groups were included to compare NET levels. The active control group consisted of 15 patients. The second control group consisted of 30 healthy subjects. Plasma NET levels did not correlate with clinical disease status, regardless of the clinic index analysed or the biological therapy administered. No significant correlation was observed between NET remnants and ultrasound synovitis. There was no correlation between plasma NET and autoantibodies. In contrast, plasma calprotectin positively correlated with clinical parameters (swollen joint count [SJC] $\rho = 0.49$; $P < 0.001$, Clinical Disease Activity Index [CDAI] $\rho = 0.30$; $P < 0.001$) and ultrasound parameters ($\rho > 0.50$; $P < 0.001$). Notably, this correlation was stronger than that observed with acute phase reactants.

Conclusion: While NET formation induced by neutrophils may play a role in RA pathogenesis, our study raises questions about the utility of NET remnants in peripheral circulation as a biomarker for inflammatory activity. In contrast, this study strongly supports the usefulness of calprotectin as a biomarker of inflammatory activity in patients with RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis; NETs; Calprotectin; Autoimmunity; Joint ultrasound

Key Summary Points

Why carry out this study?

Classical acute phase reactants do not always reflect the synovitis in the patient and may be influenced by other factors.

The search for new biomarkers of disease activity has been a growing field of research in recent years.

Extensive research has reported that the innate immune system, especially the involvement of neutrophils, plays a central role in the initiation and perpetuation of rheumatoid arthritis (RA).

The objective of this study is to determine the performance of neutrophil activation markers, including neutrophil extracellular traps (NETs) and calprotectin, as biomarkers of disease activity using clinical and joint ultrasound (US) parameters in patients with established RA.

We also analyse the relationship between NETs and various types of therapies as well as their association with autoimmunity.

What was learned from this study?

While NET formation induced by neutrophils may play a role in RA pathogenesis, our study raises questions about the utility of NET remnants in peripheral circulation as a biomarker for inflammatory activity.

This study strongly supports the usefulness of calprotectin as a biomarker of inflammatory activity in patients with RA.

This study represents an important contribution to the growing body of research exploring the association among NETs, disease activity and autoantibodies in RA.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic autoimmune disease characterized by synovial inflammation and cartilage and joint destruction [1]. Over the past few decades, the prognosis of this disease has improved significantly thanks to the adoption of a treat-to-target approach, early diagnosis and treatment, and

the utilization of more effective antirheumatic drugs [2, 3]. Currently, close monitoring of the inflammatory disease activity in RA is strongly recommended using a therapeutic goal of achieving remission or low disease activity [2, 4]. In addition to clinical parameters, traditional acute phase reactants (APRs) such as the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) serum concentration are commonly employed as laboratory markers to assess disease activity in RA. These parameters are also integrated into composite disease activity indices like the Simplified Disease Activity Index (SDAI) or the Disease Activity Score 28 (DAS28) for longitudinal evaluation [5]. However, while commonly used, APRs may not always reflect the degree of active synovitis in patients with RA accurately.

Extensive research has demonstrated the significant involvement of adaptive immunity in the pathogenesis of RA. Systemic autoimmunity is found in most patients with RA, with the presence of characteristic autoantibodies such as rheumatoid factor (RF) or anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPAs). However, mounting evidence indicates that the innate immune system, especially the involvement of neutrophils, plays a central role in the initiation and perpetuation of RA, both directly through its effects on the synovium and indirectly via its own inflammatory response and by modulating that of the adaptive immune system [6–8]. In recent years, increasing attention has been paid to the role of neutrophils and their products in RA. Calprotectin (S100A9/S100A8), a protein member of the S100 family which is secreted by activate neutrophils, seems to play a significant role in the inflammatory cascade in RA. Calprotectin is a significant proinflammatory factor of innate immunity and acts as an endogenous damage-associated molecular pattern (DAMP) through the activation of TLR4 [9]. Moreover, when secreted into the synovium, calprotectin subsequently enters peripheral blood circulation. Levels of calprotectin in serum or plasma have been found to correlate closely with inflammatory disease activity in patients with RA and therefore provide a more accurate reflection of the patient's clinical status than APRs [10–13].

In 2004, a mechanism of action was reported for neutrophils through the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) [14]. NETs are extracellular structures that contain neutrophil DNA, histones and proteins and which are ejected into the extracellular medium in the form of a network. NETs provide an alternative defence mechanism and may play a crucial role in regulating the immune response and maintaining bodily homeostasis. They are formed through a process called NETosis, which can be triggered by various stimuli, including both infectious and sterile factors such as autoantibodies or immunocomplexes [15].

The role of NETs in RA has garnered significant interest in recent years. These inflammatory structures are believed to have both local and systemic effects, potentially contributing to the initiation and perpetuation of the disease through autoantigen exposure [16–21]. Furthermore, NETs have been identified as a source of specific autoantigens in RA, including ACPAs and anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies [22–26]. Patients with RA demonstrate elevated NET formation compared to the general population, revealing NETs to be a promising potential biomarker for the disease [27]. However, the precise role of NETs in disease activity remains uncertain as studies evaluating their utility as a biomarker have produced conflicting results [17, 25, 26, 28].

The objective of this study is to determine the performance of neutrophil activation markers, including NETs and calprotectin, as biomarkers of disease activity using clinical and joint ultrasound (US) parameters in patients with established RA. The study also aims to examine the relationship between NETs and various types of therapies as well as their association with serum autoantibodies.

METHODS

Design and Study Population

We performed an observational cross-sectional study. Patients with RA (ACR/EULAR 2010 criteria) [29] from our Arthritis Unit who had been undergoing treatment with biological disease-

modifying antirheumatic drugs (DMARDs), tumour necrosis factor inhibitors (anti-TNF), monoclonal antibodies against IL-6 receptors (anti-IL6r) or Janus kinase inhibitors (JAKi) for at least 3 months were consecutively included, irrespective of their disease activity status, previous use of DMARDs (including biological therapies or JAKi) or concomitant treatment (such as with methotrexate or others). Patients who displayed signs of active infection or other clinical conditions that could impact the determination of neutrophil activation markers (calprotectin or NETs) or APR measurements, as determined by the researcher concerned, were excluded. Demographic data, disease duration, autoantibody status (RF, ACPAs and anti-CarP), radiological data (presence/absence of erosive disease) and information on previous biological therapy and concurrent treatments were collected.

Two control groups were included to assess NET levels. The first consisted of patients with RA [29] from our Arthritis Unit with high disease activity, defined as those with at least four inflamed joints, regardless of treatment or disease duration. The second control group was comprised of healthy subjects.

Measurement of Clinical Disease Activity

All patients received a clinical evaluation that included the counting of 28 swollen and tender joints (28SJC and 28TJC) as well as physician and patient self-reported global assessments (PhGA and PGA respectively) using visual analogue scales ranging from 0 to 10 along a centimetre scale. Subsequently, composite disease activity indices such as DAS28, SDAI and CDAI (Clinical Disease Activity Index) were calculated. Additionally, patients were asked to complete two questionnaires: the Health Assessment Questionnaire (HAQ) and Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID3).

Assessment of Biomarkers

Acute Phase Reactants

Blood samples were collected concurrently with the clinical assessment. ESR was measured using the Westergren method (normal value

[NV] < 20 mm/h) and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) plasma concentration using an immunoturbidimetric method measured with Siemens Atellica® Solution (lowest limit of detection: 0.02 mg/dl; NV < 0.4 mg/dl).

Plasma Calprotectin

Calprotectin was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit (CALPROLAB ALP [CALPRO], Menarini Diagnósticos S.A.) following the manufacturer's instructions. Briefly, 100 µl aliquots of each standard, control and diluted 1:20 sample in duplicate wells were incubated at room temperature for 40 min; three washings were performed, 100 µl of the conjugated enzyme was added and the plates were incubated at room temperature for another 40 min. After three further washes and the addition of the enzyme substrate, optical density values at 405 nm were determined using an ELISA reader. To reduce variation in calprotectin determinations, the whole procedure was performed in a Triturus Autoanalyzer; the coefficients of variation were 5% within and 13% between assays. This technique had already been used by our group for previous studies[11].

Assessment of NETs

NETs were indirectly determined by measuring their remnants in plasma. Neutrophil elastase-DNA (NE-DNA) and histone-DNA (H3-DNA) complex levels were determined using a tailor-made ELISA[30, 31]. A 96-well plate was coated with 100 µl of capture antibodies, anti-elastase (Millipore cat. no. 481001) and anti-histone H3 citrulline (Abcam cat. no. ab5103) at 2.5 µg/ml in sterile PBS. The ELISA plates were incubated overnight at 4 °C without agitation to allow the binding of capture antibodies. The next day, the wells were washed three times with PBS-Tween 20 (200 µl/well) and blocked with PBS-1% BSA (200 µl/well) at room temperature for 1 h. Again, three repeated washes with PBS-Tween 20 (200 µl/well) were performed. Diluted plasma (1:100, with PBS-1% BSA) was added to the wells (100 µl/well) and again incubated overnight at 4 °C but with agitation (100–150 rpm). Three washes with PBS-Tween 20 (200 µl/well) were

performed to remove unbound NETs and other components. Mouse anti-dsDNA (Millipore cat no. MAB030) diluted 1:100 with PBS-1% BSA was added to the wells (100 μ l/well) and incubated for 1 h, at room temperature, with agitation (100–150 rpm). The plates were washed three more times with PBS-Tween 20 (200 μ l/well). Goat anti-mouse, HRP conjugate (Millipore cat no. AP127P) diluted 1:10,000 was added (100 μ l/well) and incubated for 1 h at room temperature. The plates were washed five times with PBS-Tween 20 (200 μ l/well). Then, TMB peroxidase substrate was added to each well (50 μ l/well) and the plate was incubated in the dark for between 10 and 15 min. The reaction was stopped by the addition of 1 M HCl to each well (50 μ l/well). Finally, absorbance was measured at 450 nm using a microplate photometer, and an OD index (OD each well/OD blank) was calculated for each well. The assay was performed in duplicate and mean values were calculated.

Assessment of Autoantibodies (RF, ACPAs and Anti-CarP)

Autoantibody status was measured in sera collected at enrolment in the study.

IgM RF was determined using a chemiluminescence assay (CIA) (QUANTA Flash®, Inova Diagnostics, CA). The assay's analytical measurement range (AMR) is from 0.3 to 490.0 IU/ml and the cut-off recommended by the manufacturer is < 5 IU/ml.

ACPA levels were determined by a tailor-made ELISA using a chimeric fibrin/filaggrin citrullinated peptide (anti-CFFCP1) as an antigen [32] biotinylated at its terminal amino group with a biotin derivative containing two polyethylene glycol (PEG) chains bound to neutravidin derivatized microtitre plates. This derivatization strategy allows for better antigenic exposure of the peptide in the ELISA plates.

Anti-CarP antibodies were also determined using a tailor-made ELISA test using carbamylated foetal calf serum (FCS-CarP) as the antigen and the non-homocitrullinated version of the

protein as the control for the homocitrulline anti-FCS-CarP detected [33].

A positive cut-off value for the tests was defined as ≥ 11.5 AU/ml and ≥ 173.5 AU/ml for ACPAs (anti-CFFCP1) and anti-CarP antibodies (anti-FCS-CarP), respectively. A result was only considered positive and specific for citrulline and/or homocitrulline when the UA/ml values were higher than the respective cut-offs and the difference in OD values between native and post-translationally modified antigens was > 0.1. Further details of the ELISA techniques are provided in the Supplementary Material.

Imaging Biomarkers: Ultrasound Score

Sonographic assessments were carried out using high-sensitivity US equipment (MyLab9®; Esaote, Genoa, Italy), a longitudinal probe with a 10–14 MHz frequency range and a pulse repetition frequency of between 800 and 900 Hz. The joint musculoskeletal US findings were defined based on the Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials (OMER-ACT) definitions [34].

In accordance with the EULAR guidelines [35], synovial hypertrophy (SH) and intra-articular power Doppler (PD) signalling of 11 joints and tendons on each hand, including the proximal interphalangeal joints, metacarpophalangeal joints and wrists, were evaluated by a single experienced sonographer (A.P.). The sonographer was blinded to the results of the clinical joint examination. SH and PD signals were graded using a four-grade semi-quantitative scoring system (0 = no, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe) according to the methodology of Szkudlarek et al. [36]. The highest grade of SH and PD signalling detected during the scans was selected as representative of each joint, respectively.

The PD score (sum of PD scores in all joints, range: 0–66), SH score (sum of SH scores in all joints, range: 0–66) and global score (sum of the PD and SH scores, range: 0–132) were calculated by adding up the scores for elementary lesions in each joint. To ensure strict criteria for defining US synovitis, only patients with SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1 were considered to have active synovitis [37]. This US assessment

method had been previously employed in prior studies conducted by our group [11]. Clinically symptomatic joints were also evaluated to assess whether US synovitis was present. However, these joints were not used to calculate the sonographic score (PD score, SH score and global US score).

Statistical Analysis

Continuous data were presented as mean and standard deviation (SD) while categorical variables were given as absolute frequency with percentages. Groups were compared using parametric or nonparametric tests according to the distribution of the variables.

Correlation analysis (Spearman's correlation coefficient) was used to assess the association between the different activity indices (clinical and US activity) and the neutrophil activation markers (NET and calprotectin plasma levels). To specifically investigate the relationship between calprotectin and the US parameters (including the US total score, SH score, and PD score), we utilized a linear regression model. This regression analysis was adjusted to account for potential confounding factors, with the selection of these variables guided solely by clinical criteria. Furthermore, similar models were constructed to assess the association among ESR, hsCRP and the US parameters. We also analysed the correlation between autoantibody levels and NETs. The performance of NETs (NE-DNA complexes and H3-DNA complexes) and calprotectin in the diagnosis of US synovitis was analysed using receiver-operating characteristic curves (ROC) with US synovitis yes/no (yes: SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1) as the gold standard. The ROC curves made it possible to identify the best cut-off point in terms of sensitivity, while specificity enabled us to calculate the area under the curve (AUC) as a measure of the overall discriminative power. The performance of ESR and hsCRP was also studied, and the three ROC curves were compared to determine which of the three parameters had the highest discriminatory power for the diagnosis of US synovitis. The test for the equality of the AUC uses an algorithm suggested by DeLong, DeLong and Clarke-Pearson (1988) [38]. Additionally, a logistic regression

model was conducted to investigate the correlation between calprotectin and the presence of US synovitis (categorized as "yes" when SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1 were present). Similar to the linear regression model, these logistic regression models were adjusted for the same confounding variables.

Analysis was carried out using SPSS software (version 27.0, IBM Inc., Chicago, IL, USA) and Stata version 13.1 (StataCorp LP 4905 Lakeway Drive College Station, TX, USA).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (reg. HCB20210783). Written informed consent was obtained from all patients before enrolment in the study.

RESULTS

Demographic, Clinical and Therapeutic Characteristics

The study included 114 patients: 90.4% women; mean age 56 ± 11 years; mean disease duration 16 ± 20 years. Most patients (86%) were seropositive for either RF or ACPAs, 67.5% had erosive disease and 31.6% had extra-articular manifestations of RA. Fifty-six patients (49%) were receiving treatment with anti-IL6r (49 tocilizumab and 7 sarilumab), 28 (25%) were receiving JAKi (19 baricitinib and 9 tofacitinib) and 30 (26%) were receiving anti-TNF treatment (21 etanercept and 9 adalimumab). The mean duration of these treatments was 56 ± 58 months. Nearly half of the patients were receiving concomitant conventional DMARD treatment (methotrexate or leflunomide) (49.1%), and 44.7% were also receiving glucocorticoid treatment (mean prednisone equivalent dose 3.3 ± 2.8 mg/day) (Table 1).

As for disease activity, the mean CDAI was 12 ± 10 ; 64.3% of the patients were in remission and/or exhibited low disease activity according to CDAI criteria (Table 2). Regarding laboratory parameters, the mean hsCRP was 0.4 ± 1.3 mg/dl, the ESR was 14 ± 18 mm/h and the mean plasma calprotectin

concentration was 0.99 ± 1.5 $\mu\text{g/ml}$. When comparing the parameters between the groups, we found that the classical APRs (both hsCRP and ESR) were significantly lower in the group of patients treated with anti-IL6r. However, we did not find statistically significant differences in plasma calprotectin levels between the groups (Table 2).

Ninety-nine patients were studied with US, of which 66 (67%) were active according to US criteria (SH score ≥ 2 and PD score ≥ 1). The mean scores for SH, PD and total US activity were 6.6 ± 6.4 , 4.1 ± 5.5 and 11 ± 12 , respectively.

When differentiating by treatment group, we found no differences between the patients in terms of the different clinical and US parameters of disease activity, except for DAS28, which was lower in the group of patients treated with anti-IL6r (Table 2).

Two control groups were included to compare NET levels. The active control group consisted of 15 patients: 93% female; mean age 54 ± 12 years. The mean disease duration was 13 ± 15 years. All these patients were seropositive, 67% had erosive disease, and 13% had extra-articular manifestations of RA. Eleven patients (73%) were not receiving targeted therapy, neither biological DMARDs nor JAKi. Four (27%) were receiving treatment with anti-IL6r, and three (20%) with rituximab. At the time of inclusion, 73% were receiving concomitant glucocorticoid therapy (mean prednisone equivalent dose 7.0 ± 7.8 mg/day). The second control group consisted of 30 healthy subjects (mean age 47 ± 10 years, 73% women).

NET Plasma Levels in RA According to the Antirheumatic Drug Group

We analysed the levels of circulating NET remnants, measured as DNA-NE complexes and DNA-H3 complexes. Plasma levels of neither NET remnant showed statistically significant differences between the treatment groups (anti-IL6r, JAKi and anti-TNF) (Table 3).

Since the assessment of NETs is a novel and non-standardized technique, we included a group of healthy subjects and a group of

patients with highly active RA, as previously defined, as negative and positive controls, respectively. Even though the active patient group exhibited higher levels of NETs than the main group and the healthy subject group, this difference did not reach statistical significance (Table 3).

Association Between NETs and Plasma Calprotectin with Clinical and Ultrasonographic Disease Activity

We analysed the correlation between neutrophil activation markers (calprotectin and NET levels) and clinical and US activity parameters as well as APRs.

We found that NET levels did not show a correlation with any of the clinical and US activity parameters analysed, either as a single group (Table 4) or when considering the different treatment groups separately (Table 5).

Plasma calprotectin showed a moderate correlation with clinical parameters (SJC rho = 0.49, PhGA rho = 0.39, CDAI rho = 0.30; $P < 0.001$) and US parameters (rho > 0.50 ; $P < 0.001$). This correlation was stronger than that observed with APR (Table 4). To further examine the relationship between plasma calprotectin levels and US parameters, we conducted a linear regression model. This analysis was adjusted to account for potential confounding factors such as gender, smoking status, disease duration, use of glucocorticosteroids and drug therapy.

Our findings revealed a positive association between plasma calprotectin and SH and PD scores. Specifically, each increase in plasma calprotectin units corresponded to an increase of 2.14 units in HS score (95% confidence interval: 0.71–3.58; P value = 0.004) and 1.66 units in PD score (95% confidence interval: 0.35–2.7; P value = 0.013). However, no significant association was observed between plasma calprotectin levels and the total US score. Similar models were applied to ESR and hsCRP but failed to demonstrate a significant association (refer to Supplementary Material for details).

When we analysed the correlations by treatment groups, we found that calprotectin

Table 1 Demographic characteristics and treatment of patients with RA

	Anti-IL6r (<i>n</i> = 56)	JAKi (<i>n</i> = 28)	Anti-TNF (<i>n</i> = 30)	Total (<i>n</i> = 114)	<i>P</i> value
Female, <i>n</i> (%)	52 (91.1)	25 (89.3)	27 (90.0)	103 (90.4)	NS
Age, years (mean ± SD)	57.3 ± 11.5	54.4 ± 11.5	57.09 ± 11.09	56.5 ± 11.3	NS
Current smoker, <i>n</i> (%)	11 (30)	7 (25.0)	9 (30.0)	37 (23.9)	NS
Disease duration, years (mean ± SD)	16.5 ± 9.1	14.4 ± 9.3	17.8 ± 13.5	16.3 ± 10.5	NS
Seropositive (RF/ACPA), <i>n</i> (%)	48 (85.7)	26 (92.9)	24 (80)	98 (86)	NS
ACPA positive, <i>n</i> (%)	36 (66.7)	18 (66.7)	15 (53.6)	69 (63.3)	
RF positive, <i>n</i> (%)	34 (63)	19 (70.4)	20 (66.7)	73 (65.8)	
Anti-CarP antibodies, <i>n</i> (%)	36 (54)	14 (51.9)	14 (50)	71 (58.7)	
Erosions, <i>n</i> (%)	43 (76.8)	18 (64.3)	16 (53.3)	77 (67.5)	NS
Extraarticular manifestations, <i>n</i> (%)	18 (32.1)	11 (39.3)	7 (23.3)	36 (31.6)	NS
Previous bDMARDs, <i>n</i> (mean ± SD)	1.3 ± 1.1	1.7 ± 1.9	0.5 ± 0.9	1.15 ± 1.4	< 0.001
Previous JAKi, <i>n</i> (%)	4 (7.1)	1 (3.6)	1 (3.3)	6 (5.3)	NS
<i>Current treatment</i>					
Concomitant cDMARDs, <i>n</i> (%)	24 (42.9)	14 (50)	18 (60.0)	56 (49.1)	NS
Concomitant glucocorticoids, <i>n</i> (%)	26 (46.4)	17 (60.7)	8 (26.7)	51 (44.7)	< 0.05
Prednisone dose (mg/day), (mean ± SD)	3.8 ± 2.5	4.9 ± 2.8	1.5 ± 2.2	3.3 ± 2.8	< 0.001
Targeted treatment duration (biological or JAKi), month (mean ± SD)	57.6 ± 39.1	15.2 ± 16.3	90.3 ± 83.8	55.8 ± 57.7	< 0.001
Type of treatment, <i>n</i> (%)					
Tocilizumab	49 (77.5)				
Sarilumab	7 (12.5)				
Baricitinib		19 (67.9)			
Tofacitinib		9 (32.1)			
Etanercept			21 (70)		
Adalimumab			9 (30)		

RA rheumatoid arthritis; anti-IL6r monoclonal antibodies against IL-6 receptors; JAKi JAK inhibitors; anti-TNF tumour necrosis factor inhibitors; ACPAs anti-citrullinated peptide/protein antibodies; RF rheumatoid factor; anti-CarP anti-carbamylated protein; bDMARDs biological disease-modifying antirheumatic drug; cDMARDs conventional disease-modifying antirheumatic drug (methotrexate or leflunomide); *n* number of patients; SD standard deviation. *P* value: ANOVA

Table 2 Clinical, ultrasound and laboratory characteristics of patients with RA

	Anti-IL6r (n = 56)	JAKi (n = 28)	Anti-TNF (n = 30)	Total (n = 114)	P value
Disease activity					
28 SJC (mean ± SD)	3.6 ± 5.4	4.0 ± 5.7	2.4 ± 3.7	3.4 ± 5.1	NS
28 TJC (mean ± SD)	1.3 ± 2.2	2.0 ± 2.6	1.4 ± 2.3	1.5 ± 2.3	NS
PGA (mean ± SD)	3.5 ± 2.3	4.1 ± 2.5	3.8 ± 8.9	3.7 ± 2.5	NS
PhGA (mean ± SD)	2.5 ± 2.3	2.9 ± 2.1	2.3 ± 2.3	2.6 ± 2.1	NS
VAS pain (mean ± SD)	3.6 ± 2.5	4.1 ± 2.5	3.0 ± 2.6	3.5 ± 2.5	NS
DAS28 (mean ± SD)	2.65 ± 1.21	3.81 ± 1.4	3.08 ± 1.17	3.05 ± 1.3	< 0.001
Remission, n (%)	33 (58.9)	6 (21.4)	11 (36.7)	50 (43.9)	
Low disease activity, n (%)	7 (12.5)	3 (10.7)	8 (26.7)	18 (15.9)	
Moderate disease activity, n (%)	15 (26.8)	16 (57.1)	9 (30.0)	40 (35.1)	
High disease activity, n (%)	1 (1.8)	3 (10.7)	2 (6.7)	6 (5.3)	
CDAI (mean ± SD)	10.92 ± 10.0	13.39 ± 10.3	10.73 ± 10.82	11.56 ± 10.25	NS
Remission, n (%)	10 (17.9)	3 (10.7)	5 (16.7)	18 (15.8)	
Low disease activity, n (%)	26 (46.4)	8 (28.6)	14 (46.7)	48 (42.1)	
Moderate disease activity, n (%)	13 (23.2)	13 (46.4)	9 (30)	35 (30.7)	
High disease activity, n (%)	7 (12.5)	4 (14.3)	2 (6.7)	13 (11.4)	
SDAI (mean ± SD)	11.1 ± 10.0	13.66 ± 10.3	10.73 ± 1.82	11.56 ± 10.3	NS
RAPID3 (mean ± SD)	9.49 ± 1.2	9.84 ± 6.2	10.9 ± 7.7	9.93 ± 6.9	NS
HAQ (mean ± SD)	1.18 ± 1.2	0.95 ± 0.7	1.06 ± 0.8	1.09 ± 1.0	NS
US parameters					
	Anti-IL6r (n = 46)	JAKi (n = 23)	Anti-TNF (n = 30)	Total (n = 99)	P Value
US synovitis, n (%)	33 (71.7)	17 (73.9)	16 (53.3)	66 (66.7)	NS
SH US, (mean ± SD)	5.64 ± 5.6	7.61 ± 7.6	6.8 ± 6.6	6.6 ± 6.4	NS
PD US, (mean ± SD)	4.83 ± 5.0	5.0 ± 6.1	4.27 ± 6.0	4.1 ± 5.5	NS
Total US score (HD + PD), (mean ± SD)	10.89 ± 10.3	12.61 ± 13.4	11.10 ± 12.4	11.4 ± 11.6	NS
Laboratory					
hsCRP, mg/dl (mean ± SD)	0.13 ± 0.3	0.37 ± 0.43	0.77 ± 2.5	0.36 ± 1.3	< 0.001
hsCRP < 0.1 mg/dl, n (%)	44 (78.6)	13 (46.4)	10 (33.3)	67 (58.8)	< 0.001
ESR, mm/h (mean ± SD)	6.25 ± 3.9	29.0 ± 29.5	15.1 ± 11.5	14.16 ± 18.3	< 0.001

△ Adis

Table 2 continued

US parameters	Anti-IL6r (n = 46)	JAKi (n = 23)	Anti-TNF (n = 30)	Total (n = 99)	P Value
Plasma calprotectin, mcg/dl (mean ± SD)	0.72 ± 0.81	1.21 ± 1.4	1.25 ± 2.2	0.98 ± 1.5	NS

RA rheumatoid arthritis; *anti-IL6r* monoclonal antibodies against IL-6 receptors; *JAKi* Janus kinase inhibitors; *anti-TNF* tumour necrosis factor inhibitors; *SJC* swollen joint count; *TJC* tender joint count; *PGA* patient global assessment. *PhGA* physician global assessment; *VAS* visual analogue scale; *DAS28* disease activity score; *CDAI* clinical disease activity index; *SDAI* simplified disease activity index; *RAPID3* routine assessment of patient index data; *HAQ* Health Assessment Questionnaire; *US synovitis* SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1; *SH* synovial hypertrophy score (0–66); *PD* power Doppler score (0–66); *US total score* ultrasound total score (0–132); *hsCRP* high-sensitivity c-reactive protein; *ESR* erythrocyte sedimentation rate; *n* number of patients; *SD* standard deviation. *P* value: ANOVA

Table 3 NET remnant levels in the main group vs control groups (active patients and healthy subjects)

	Main group (n = 114)	Anti-IL6r (n = 56)	JAKi (n = 28)	Anti-TNF (n = 30)	Active RA control group (n = 15)	Healthy control (n = 30)	Total (n = 159)	P value*
NE-DNA complex, ratio (mean ± SD)	1.11 ± 0.40	1.13 ± 0.3	1.04 ± 0.2	1.13 ± 0.6	2.59 ± 4.7	1.16 ± 0.9	1.25 ± 1.4	NS
H3-DNA complex, ratio (mean ± SD)	1.10 ± 0.27	1.11 ± 0.32	1.05 ± 0.2	1.13 ± 0.2	2.41 ± 3.9	1.27 ± 1.4	1.25 ± 1.4	NS

NET neutrophil extracellular traps; *anti-IL6r* monoclonal antibodies against IL-6 receptors; *JAKi* Janus kinase inhibitors; *anti-TNF* tumour necrosis factor inhibitors; *NE-DNA complex* neutrophil elastase-DNA complexes (NETs); *H3-DNA complex*: histone-DNA complexes. **P* value represents the differences principal group vs. active patients or healthy controls. *P* value: ANOVA

showed a moderate or strong correlation with US parameters, unlike classical APR; this is especially relevant for the group of patients treated with IL6 inhibitors (Table 5).

When analysing the discriminatory capacity by the AUC of both the neutrophil biomarkers of the presence of active US synovitis, calprotectin demonstrated an excellent capacity (Fig. 1) but plasma NETs did not (Figs. 2 and 3). This discriminatory capacity of plasma calprotectin was reflected by an AUC of 0.812 (95% confidence interval [CI]: 0.729–0.894), in contrast to the lower discriminatory capacity of hsCRP and ESR, with AUCs of 0.598 (0.531–0.665) and 0.560 (0.444–0.676), respectively (Fig. 1a). When we analysed the

treatment groups separately, we found that these differences were maintained (Fig. 1b, c and e).

Furthermore, a logistic regression model was employed to examine the association between calprotectin and the presence of US synovitis (categorized as “yes” when SH grade ≥ 2 plus PD signal ≥ 1 was present). Using a calprotectin level of 0.4 mcg/dl as the cut-off point, our analysis indicated that patients with plasma calprotectin values > 0.4 mcg/dl faced an 11-fold higher risk of being identified as active via ultrasound compared to those with lower values (OR 11.31; 95% CI 3.18–40.17; *P* < 0.001) (refer to Supplementary Material for details).

Table 4 Correlation of NETs and plasma calprotectin with clinical and ultrasonographic disease activity

	hsCRP	ESR	Plasma calprotectin	NE-DNA complex	H3-DNA complex
hsCRP		0.412**	0.505**	– 0.127	– 0.037
ESR	0.412**		0.252**	– 0.035	0.023
plasma calprotectin	0.505**	.252**		– 0.045	– 0.162
NE-DNA complex	– 0.127	– 0.035	– 0.045		0.237*
H3-DNA complex	– 0.037	0.023	– 0.162	0.237*	
28TJC	0.065	0.085	0.139	0.053	– 0.147
28SJC	0.261**	0.131	0.494**	– 0.051	– .215*
PGA	0.026	0.115	0.183	0.059	– 0.063
PhGA	0.197*	0.141	0.389**	– 0.07	– 0.173
CDAI	0.149	0.157	0.297**	0.014	– 0.181
SDAI	0.179	0.168	0.326**	0.009	– 0.18
DAS28	0.296**	.552**	0.348**	0.007	– 0.116
SH score	0.227*	0.177	0.504**	– 0.097	– 0.19
PD score	0.237*	0.117	0.553**	– 0.043	– 0.196
US total score	0.247*	0.16	0.539**	– 0.088	– 0.197

NET neutrophil extracellular traps; hsCRP high-sensitivity c-reactive protein; ESR erythrocyte sedimentation rate; NE-DNA complex: neutrophil elastase-DNA complexes (NETs); H3-DNA complex: histone-DNA complexes; 28TJC tender joint count; 28SJC swollen joint count; PGA patient global assessment. PhGA physician global assessment; CDAI clinical disease activity index; SDAI simplified disease activity index; DAS28 disease activity score; SH synovial hypertrophy score; PD power Doppler score; US total score ultrasound total score
 *P value < 0.05; **P value < 0.001; Spearman's rho

Correlation Results Between NETs and Autoantibody Levels

We analysed potential correlations between NET levels and autoantibodies (ACPAs, anti-CarP antibodies and RF). However, our results showed no correlations, even when autoantibody status was categorized into different quartiles (data not shown). We also did not find any differences in plasma NET levels when we classified patients as seropositive or seronegative for each of the autoantibodies analysed (Table 6).

Correlation Results Between Calprotectin and ACPA Status

We have analysed whether the correlation of calprotectin with clinical and ultrasound parameters of disease activity differs based on ACPA status (ACPA positive vs ACPA negative).

We have observed that patients who are ACPA positive maintain a strong correlation between plasma calprotectin levels and indices of clinical disease activity. However, in the ACPA-negative patient group, this correlation diminishes. On the other hand, when analysing the correlation with US parameters, we did not find any differences between the two subgroups (Table 7).

Table 5 Correlation of NETs and plasma calprotectin with clinical and ultrasonographic disease activity by treatment group

	Anti-IL6 ^a				JAK1				Anti-TNF								
	hsCRP	ESR	Plasma calprotectin	NE-DNA complex	hsCRP	ESR	Plasma calprotectin	NE-DNA complex	hsCRP	ESR	Plasma calprotectin	NE-DNA complex	hsCRP	ESR	Plasma calprotectin	NE-DNA complex	
hsCRP	0.069	0.298*	0.298*	-0.028	-0.061	0.428*	0.255	-0.295	-0.017	0.428*	0.255	-0.295	0.233	0.233	.515**	0.142	-0.234
ESR	0.069	0.158	0.158	-0.059	0.032	0.428*	0.428*	-0.027	0.11	0.233	0.428*	-0.027	0.11	0.233	0.063	0.3	-0.07
plasma calprotectin	0.298*	0.158	0.158	0.024	-0.151	0.549**	0.255	-0.372	-0.063	0.515**	0.255	-0.372	-0.063	0.515**	0.063	0.149	-0.355
NE-DNA complex	-0.028	-0.059	0.024	0.323*	-0.295	-0.027	-0.372	0.143	0.143	0.323*	-0.027	-0.372	0.143	0.323*	0.149	0.235	0.235
H3-DNA complex	-0.061	0.032	-0.151	0.323*	-0.017	0.11	-0.063	0.143	0.143	-0.017	0.11	-0.063	0.143	-0.017	0.11	0.235	0.235
28TJC	0.04	0.136	0.203	-0.025	-0.1	0.05	0.02	-0.161	0.206	0.05	0.02	-0.161	0.206	0.05	0.02	0.325	0.061
28SJC	0.123	0.022	0.453**	-0.002	-0.245	0.363	.475*	0.336	0.01	0.363	.475*	0.336	0.01	0.363	.475*	0.087	-0.405*
PGA	-0.077	0.216	0.22	0.2	-0.028	0.065	0.174	0.049	0.01	0.065	0.174	0.049	0.01	0.065	0.174	0.164	-0.136
PhGA	0.091	0.198	0.403**	-0.087	-0.17	0.323	0.345	0.213	0.12	0.323	0.345	0.213	0.12	0.323	0.291	-0.141	0.317
CDAI	0.057	0.21	0.316*	0.02	-0.171	0.251	0.325	0.117	0.159	0.251	0.325	0.117	0.159	0.251	.444*	-0.089	-0.27
SDAI	0.08	0.228	0.341*	0.028	-0.162	0.279	0.334	0.128	0.148	0.279	0.334	0.128	0.148	0.279	.456*	-0.102	-0.302
DAS28	0.058	.453**	0.320*	0.025	-0.096	0.312	0.540**	0.199	0.084	0.312	0.540**	0.199	0.084	0.312	.383*	.366*	-0.286
SH score	0.196	0.074	0.497**	-0.176	-0.205	0.391	0.689**	0.647**	0.097	0.391	0.689**	0.647**	0.097	0.391	.380*	0.094	-0.297
PD score	0.16	-0.029	0.506**	-0.028	-0.206	0.541**	0.678**	0.669**	-0.131	0.541**	0.678**	0.669**	-0.131	0.541**	.567**	0.017	-0.419*
US total score	0.197	0.048	0.511**	-0.128	-0.193	0.528**	0.699**	0.705**	-0.079	0.528**	0.699**	0.705**	-0.079	0.528**	.456*	0.07	-0.366*

NET neutrophil extracellular traps; anti-IL6^a monoclonal antibodies against IL-6 receptors; JAK1 Janus kinase inhibitors; anti-TNF tumour necrosis factor inhibitors; hsCRP high sensitivity c-reactive protein; ESR erythrocyte sedimentation rate; NE-DNA complex neutrophil elastase-DNA complexes (NETs); H3-DNA complex histone-DNA complexes; 28TJC tender joint count; 28SJC swollen joint count; PGA patient global assessment; PhGA physician global assessment; CDAI clinical disease activity index; SDAI simplified disease activity score; DAS28 disease activity score; SH synovial hypertrophy score; PD power Doppler score; US total score ultrasound total score
^aP value < 0.05; **P value < 0.001; Spearman's rho

△ Adis

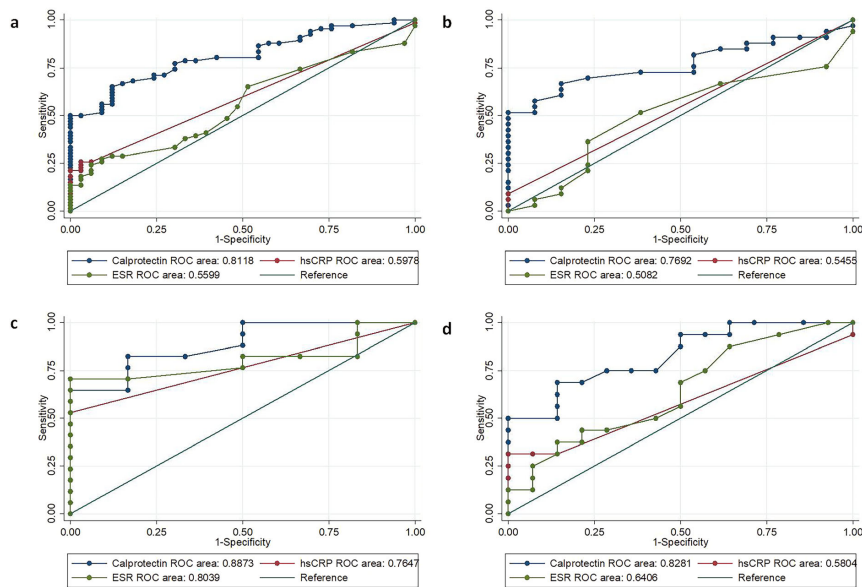


Fig. 1 ROC curves of plasma calprotectin, hsCRP and ESR vs ultrasound synovitis according to type of treatment. **a** Main group ($n = 114$); **b** anti-IL6r ($n = 56$); **c** JAKi ($n = 28$); **d** anti-TNF ($n = 30$). *Anti-IL6r*

monoclonal antibodies against IL-6 receptors; *JAKi* JAK inhibitors; *anti-TNF* tumour necrosis factor inhibitors; *hsCRP* high sensitivity C-reactive protein; *ESR* erythrocyte sedimentation rate; *ROC* receiver-operating characteristic

DISCUSSION

One of the main objectives of the present study was to assess the utility of plasma NET remnants as a parameter for evaluating clinical disease activity in patients with established RA. However, our findings demonstrated that plasma NET levels did not reflect the inflammatory disease status in our patients, regardless of the specific targeted therapy group analysed. Furthermore, we investigated the potential relationship between NET remnants and US-detected synovitis, but no significant association was observed. These results are consistent with previous studies that also failed to find a significant association between peripheral blood levels of NETs and disease activity [17, 39, 40]. However, some studies have shown an association with clinical disease activity, but

those studies are heterogeneous, included limited numbers of patients and the associations described are weak and only have a few of the activity parameters analysed [21, 25, 26, 28, 41, 42].

The lack of correlation between NETs and inflammatory disease activity in our cohort may be attributed to the inclusion of patients undergoing biological or JAKi treatment with low disease activity. Nevertheless, even in our control group consisting of patients with high disease activity, NET levels were only slightly elevated and there were no significant differences compared to the main group. These findings indicate very strongly that NET remnants cannot be considered reliable biomarkers of disease activity in patients with RA, particularly those receiving targeted treatment. It is important to note, however, that the observed

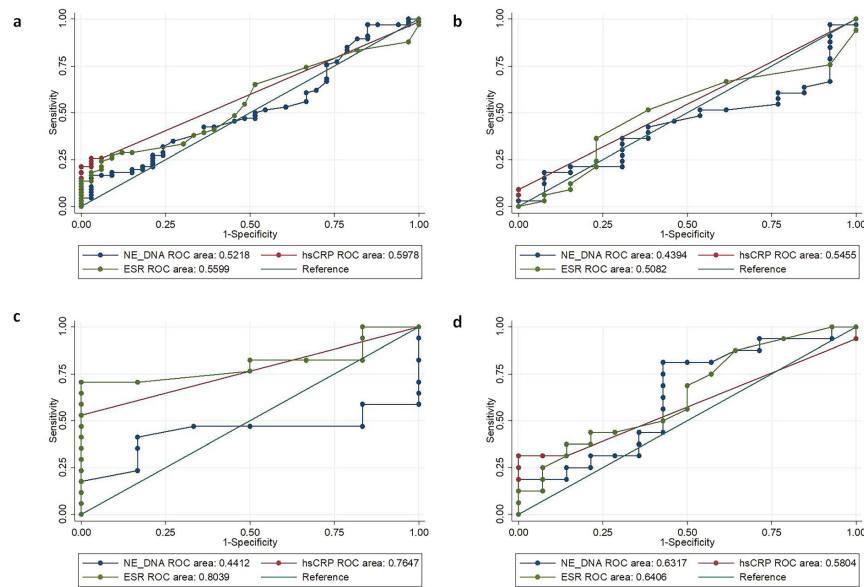


Fig. 2 ROC curves of NE-DNA complexes, hsCRP and ESR vs ultrasound synovitis according to type of treatment. **a** Main group ($n = 114$); **b** anti-IL6r ($n = 56$); **c** JAKi ($n = 28$); **d** anti-TNF ($n = 30$). *Anti-IL6r* monoclonal antibodies against interleukin-6 receptors; *JAKi*

JAK inhibitors; *anti-TNF* tumour necrosis factor inhibitors; *NE-DNA complex* neutrophil elastase-DNA complexes (NETs); *hsCRP* high sensitivity C-reactive protein; *ESR* erythrocyte sedimentation rate; *ROC* receiver-operating characteristic

low levels of NETs in our patients may be influenced by the effect of biologics or JAKi, as previous research has reported reductions in NET formation following different treatments with biological drugs [28, 41].

The involvement of NETs in the pathogenesis of RA and their potential as a antigenic source and autoantibodies has been suggested [16, 22, 43]. Therefore, in this study, we aimed to determine the association between plasma NETs and the characteristic autoantibodies seen in RA. We simultaneously measured the levels of RF, ACPAs and anti-CarP antibodies in the same blood samples used for analysing NET levels. We did not find any correlation between the titres of autoantibodies and the levels of NETs in peripheral blood. Low levels of NETs

together with the effect of biological therapy may affect the possible relationship between antibody levels and NET remnants in our cohort. One study found an association between ACPA titres and serum NET remnants (myeloperoxidase-DNA and NE-DNA complexes) in patients with RA, but only in those patients with extremely high ACPA levels [24]. The discrepancies observed between those findings and our study may be attributed to factors such as geographic origin, disease duration, methodological issues in NET determination or differences in drug therapies among the study populations.

The lack of association of plasma NET remnants and autoantibody levels in our study does not rule out a role for NETs in autoantibody

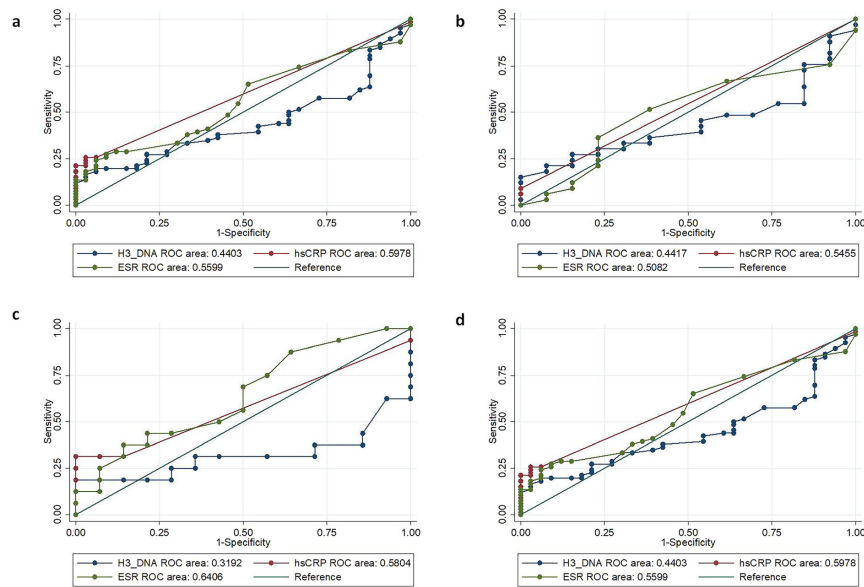


Fig. 3 ROC curves of H3-DNA complexes, hsCRP and ESR vs ultrasound synovitis according to type of treatment. **a** Main group ($n = 114$); **b** anti-IL6r ($n = 56$); **c** JAKi ($n = 28$); **d** anti-TNF ($n = 30$). *Anti-IL6r* monoclonal antibodies against interleukin-6 receptors; *JAKi*

Janus kinase inhibitors; *anti-TNF* tumour necrosis factor inhibitors; *H3-DNA complex* histone-DNA complexes (NETs); *hsCRP* high-sensitivity C-reactive protein; *ESR* erythrocyte sedimentation rate; *ROC* receiver-operating characteristic

production in RA as a consequence of higher antigenic exposition. Several in vitro studies corroborate the role of NETs in autoantibody production and the idea that autoantibodies stimulate neutrophils to form NETs [16, 22, 43]. In vitro studies have also demonstrated that neutrophils from patients with RA exhibit increased spontaneous NET formation, which correlates with levels of ACPAs [17, 22]. One major factor that predisposes patients to exacerbated NETosis is the proinflammatory environment present in RA-affected tissues. This inflammatory milieu, generated by cells such as synovial fibroblasts, dendritic cells and macrophages releasing proinflammatory cytokines like TNF- α , IL-1 β and interferon-gamma (IFN- γ), can activate neutrophils and promote their migration to inflamed joints. Once there, the

neutrophils are continuously stimulated by the proinflammatory environment, triggering the release of NETs. Exposure of neutrophils to sera from patients with RA, especially those with elevated ACPA and RF levels, as well as the inflammatory cytokines IL-17A and TNF, induces NET formation in isolated RA neutrophils, which are more susceptible to NET formation than those from healthy individuals [22]. NETs are also an important source of carbamylated proteins in patients with RA [44]. Anti-CarP antibodies are frequently present in RA and are associated with increased joint destruction, mortality and interstitial lung disease [33, 45]. These antibodies can activate osteoclasts and contribute to bone resorption, thus suggesting a causal relationship with bone damage in RA [44]. Moreover, the specific types of NETs

Table 6 NET titres in patients according to autoantibody positivity

	ACPA			AntiCarP			RF		
	Negative (n = 40)	Positive (n = 79)	P value	Negative (n = 50)	Positive (n = 71)	P value	Negative (n = 38)	Positive (n = 73)	P value
NE-DNA complex, mean (SD)	1.12 (0.52)	1.10 (0.31)	NS	1.04 (0.26)	1.17 (0.47)	NS	1.05 (0.27)	1.14 (0.45)	NS
H3-DNA complex, mean (SD)	1.05 (0.23)	1.13 (0.30)	NS	1.05 (1.76)	1.14 (0.32)	NS	1.06 (0.22)	1.12 (0.30)	NS

NET neutrophil extracellular traps; NE-DNA complex neutrophil elastase-DNA complexes (NETs); H3-DNA complex histone-DNA complexes (NETs). ACPAs anti-citrullinated peptide/protein antibodies; antiCarP anti-carbamylated protein antibodies; RF rheumatoid factor, SD standard deviation

Table 7 Correlation of plasma calprotectin with clinical and ultrasonographic disease activity, by ACPA status

	ACPAs negative	ACPAs positive
CDAI	0.04	0.413**
SDAI	0.079	0.438**
DAS28	0.16	0.459**
28TJC	− 0.093	0.262*
28SJC	0.493**	0.466**
PGA	− 0.067	0.333**
PhGA	0.186	0.473**
SH score	0.589**	0.468**
PD score	0.588**	0.545**
US total score	0.608**	0.511**

CDAI clinical disease activity index; SDAI simplified disease activity index; DAS28 disease activity score; 28TJC tender joint count; 28SJC swollen joint count; PGA patient global assessment; PhGA physician global assessment; SH synovial hypertrophy score; PD power Doppler score; US total score ultrasound total score
*P value < 0.05; **P value < 0.001; Spearman's rho

involved in RA pathogenesis warrant further investigation. While some studies have identified specific NET components, such as citrullinated proteins, others have highlighted the

presence of histones or antimicrobial peptides. Understanding the heterogeneity of NETs and their contribution to disease processes is crucial if we are to gain deeper insight into the complex mechanisms of RA.

Overall, the induction of NETs by autoantibodies, the association between blood NET levels and ACPA titres and the variations observed in different experimental settings together emphasize the intricate nature of the involvement of NETs in RA pathogenesis. Further research is needed to elucidate the specific subtypes and functional roles of NETs in the context of disease progression and treatment response.

Additionally, we examined a well-known neutrophil activity marker: calprotectin. Our results confirm that calprotectin is a good biomarker of disease activity in patients with RA, showing a correlation with activity measured by clinical and US parameters. It is a promising biomarker with potential use in monitoring patients, especially those using treatments that modify the levels of classical APR, such as anti-IL6r [46, 47] or JAKi [46, 47]. These results are in line with the existing literature. Previous studies have indicated that this protein reflects a patient's clinical status more accurately than APRs [10–13], including clinical remission or low disease activity. Furthermore, calprotectin serves as a prognostic biomarker for radiographic progression [48], a marker of

therapeutic response to specific targeted DMARDs [20], and it has proved useful in predicting disease flares in seemingly controlled patients [49]. A recent publication by Sejersen et al. explored the relationship between calprotectin levels and autoantibody-characterized subgroups [50]. They described association between circulating calprotectin and inflammation in patients who are ACPA positive but not in patients with RA who are ACPA negative. In line with this research, our analysis of the cohort, stratified based on autoantibody status, revealed a notable correlation between calprotectin and clinical parameters in patients with RA who are ACPA positive but not in patients who are ACPA negative. However, interestingly, we did not observe any significant differences in ultrasound (US) parameters. It is important to note that the sample size in the seronegative subgroup in our cohort was small.

The present study has some limitations. First, the methodology used to assess NETs relied on an ELISA that detects proteins expressed in NETs but which are not exclusive to these structures. This indirect approach may have introduced variability and potential bias into the results. Another limitation of our study was its cross-sectional design, which restricted our ability to establish causality or observe changes in NET levels over time. Additionally, the patient cohort in our study consisted of individuals with long-standing RA who were undergoing targeted therapies. These treatments may influence the levels of NETs, potentially leading to lower levels than those observed in patients who were naive to treatment. It is essential to acknowledge the potential confounding effect of medications on NET levels and to consider studying patients at different disease stages to better understand the dynamics of NETs in RA.

Despite these limitations, this study constitutes a significant contribution to the expanding body of research investigating the interplay among NETs, disease activity and autoantibodies in RA. However, based on the results of this study, we cannot advocate for the routine clinical measurement of NETs to monitor disease activity. Conversely, our findings solidify the notion that calprotectin serves as an

exceptionally valuable biomarker for assessing inflammatory activity (both clinical and ultrasonographic). It plays a pivotal role, particularly in evaluating patients undergoing treatments that inhibit the production of classical RFA, such as rIL6 antagonists or JAKi.

CONCLUSION

NET formation induced by neutrophils may play a potential role in RA, but our results question the utility of NET remnants in peripheral circulation as a biomarker of inflammatory activity in this disease. No association between NETs and clinical and US disease activity or with autoantibodies was observed. By contrast, our study clearly confirms the usefulness of blood calprotectin, a protein derived from neutrophil activation, as a biomarker of inflammatory activity and local synovitis in patients with RA, thereby confirming the results of previous studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the assistance provided by the nurses Nuria Sapena and Marta Bassas from the Rheumatology department, the assistance with statistics provided by Fernando Alonso (Spanish Society of Rheumatology) and technical advice from Toffa Evans.

Author Contributions. Beatriz Frade-Sosa: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Writing – original draft; Writing – review & editing. Andrés Ponce: Methodology; Project administration; review & editing. Estibaliz Ruiz-Ortiz: Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing. Noemi de Moner: Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing. María J. Gómara: Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing. Ana Belén Azuaga: Writing – review & editing. Juan Camilo Sarmiento-Monroy: Writing – review & editing. Rosa Morlà: Writing – review & editing. Virginia Ruiz-Esquide: Writing – review &

editing. Laura Macías: Writing – review & editing. Nuria Sapena: Writing – review & editing. Lola Tobalina: Writing – review & editing. Julio Ramirez: Writing – review & editing. Juan D. Cañete: Writing – review & editing. Jordi Yague: Investigation; Writing – review & editing. Josep M. Augé: Investigation; Writing – review & editing. José A. Gómez-Puerta: Writing – review & editing. Odette Viñas: Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing. Isabel Haro: Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing. Raimon Sanmartí: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Validation; Visualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Funding. This study was partially supported by a donation from Openbank through its “Open Solidario” program. This work was partially supported by a grant to I.H. (PID2021-122216OB-I00) funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness at the European Regional Development Fund. The journal’s Rapid Service Fee will be funded by the authors.

Data Availability. The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of Interest. Beatriz Frade-Sosa received support for attending meetings and/or speaker honoraria from Pfizer, AbbVie, Lilly, BMS, Galápagos, Sandoz and GSK. Laura Macías received support for attending meetings and/or travel from Diasorin in 19 October (LabClin Congress). Juan Camilo Sarmiento-Monroy received support for attending meetings and/or speaker honoraria from Pfizer, AbbVie, Lilly, BMS, Galápagos, Astrazeneca and GSK. Jose A. Gómez-Puerta received speaker honoraria from AbbVie, BMS, Galápagos, GSK, Lilly, Pfizer, Sanofi and Roche. Raimon Sanmartí received speaker honoraria and/or investigation grants

from AbbVie, BMS, Gebro-Pharma, Lilly, MSD, Pfizer, Sandoz, Sanofi and Roche. Andrés Ponce, Estibaliz Ruiz, Noemi de Moner, María J Gómara, Ana Belén Azuaga, Rosa Morlà, Virginia Ruiz-Esquide, Nuria Sapena, Lola Tobalina, Julio Ramirez, Juan D Cañete, Jordi Yague, Josep M. Augé, Odette Viñas and Isabel Haro declare they have no conflicts of interest. No pharmaceutical companies have participated or influenced the development of this manuscript.

Ethical Approval. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Reg. HCB20210783). Informed consent was obtained from all patients before enrolment in the study.

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License, which permits any non-commercial 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-nc/4.0/>.

REFERENCES

1. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020;110: 102400.
2. van Vollenhoven R. Treat-to-target in rheumatoid arthritis—are we there yet? *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15:180–6.

3. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79:S685–99.
4. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:3–15.
5. Aletaha D, Smolen JS. The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006;32(1):9–44.
6. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegatti E, Roccatello D, Collantes-Estevez E, Lopez-Pedreira C, et al. Neutrophils: novel key players in rheumatoid arthritis. current and future therapeutic targets. *Autoimmun Rev*. 2018;17:1138–49.
7. Zhang L, Yuan Y, Xu Q, Jiang Z, Chu CQ. Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Biomed Res*. 2020;34:86.
8. O’Neil LJ, Kaplan MJ. Neutrophils in rheumatoid arthritis: breaking immune tolerance and fueling disease. *Trends Mol Med*. 2019;25:215–27.
9. Inciarte-Mundo J, Frade-Sosa B, Sanmartí R. From bench to bedside: calprotectin (S100A8/S100A9) as a biomarker in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2022;13:1001025.
10. Inciarte-Mundo J, Victoria Hernández M, Ruiz-Esquide V, Raquel Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Cuervo A, et al. Serum calprotectin versus acute-phase reactants in the discrimination of inflammatory disease activity in rheumatoid arthritis patients receiving tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68:899–906.
11. Frade-Sosa B, Ponce A, Inciarte-Mundo J, Morlà R, Ruiz-Esquide V, Macías L, et al. Plasma calprotectin as a biomarker of ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis patients receiving IL-6 antagonists or JAK inhibitors. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2022;14:1759720X2211141.
12. Inciarte-Mundo J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Cabrera-Villalba SR, Ramirez J, Cuervo A, et al. Serum Calprotectin more accurately discriminates the inflammatory disease activity of rheumatoid arthritis patients receiving tnf inhibitors than acute phase reactants. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;68:899–906.
13. Inciarte-Mundo J, Ruiz-Esquide V, Hernández MV, Cañete JD, Cabrera-Villalba SR, Ramirez J, et al. Calprotectin more accurately discriminates the disease status of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab than acute phase reactants. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54:2239–43.
14. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532–5.
15. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(8):467–75.
16. Song W, Ye J, Pan N, Tan C, Herrmann M. Neutrophil extracellular traps tied to rheumatoid arthritis: points to ponder. *Front Immunol*. 2020;11: 578129.
17. Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2018;21:415–21.
18. Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016;99:265–78.
19. Berthelot JM, Le Goff B, Neel A, Maugars Y, Hamidou M. NETosis: at the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. *Joint Bone Spine*. 2017;84(3):255–62.
20. Zhao J, Jiang P, Guo S, Schrodi SJ, He D. Apoptosis, autophagy, NETosis, necroptosis, and pyroptosis mediated programmed cell death as targets for innovative therapy in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2021;12: 809806.
21. Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Jiménez-Gómez 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;82:31–40.
22. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandhan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40.
23. O’Neil LJ, Oliveira CB, Wang X, Navarrete M, Barrera-Vargas A, Merayo-Chalico J, et al. Neutrophil extracellular trap-associated carbamylation and histones trigger osteoclast formation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2023;82(5):630–8.
24. Wu S, Peng W, Liang X, Wang W. Anti-citrullinated protein antibodies are associated with neutrophil

- extracellular trap formation in rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(3): e23662.
25. Rezende Oliveira S, Almeida A, de Arruda J, Henriques Schneider A, Florindo Carvalho V, Cavalcante Machado C, Ice Dias Corrê J, et al. Are neutrophil extracellular traps the link for the cross-talk between periodontitis and rheumatoid arthritis physiopathology? *Rheumatology (Oxford).* 2021;61:174–84.
 26. Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, et al. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: a pilot case-control study. *PLoS ONE.* 2018;13(2): e0192365.
 27. 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):R122.
 28. Luque-Tévar M, Perez-Sanchez C, Patiño-Trives AM, Barbaroja N, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, et al. Integrative clinical, molecular, and computational analysis identify novel biomarkers and differential profiles of anti-TNF response in rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2021;12: 631662.
 29. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–81.
 30. Byrd AS, Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Carlucci PM, Cisar C, Rosenberg AZ, et al. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa. *Sci Transl Med.* 2019. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav5908>.
 31. Seto N, Torres-Ruiz JJ, Carmona-Rivera C, Pinal-Fernandez I, Pak K, Purmalek MM, et al. Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. *JCI Insight.* 2020. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134189>.
 32. Pérez ML, Gómara MJ, Ercilla G, Sanmartí R, Haro I. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem.* 2007;50:3573–84.
 33. Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Casafont-Solé I, et al. Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis.* 2020;79:587–94.
 34. Backhaus M, Burmester GR, Gerber T, Grassi W, Machold KP, Swen WA, et al. Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology [Internet]. *Ann Rheum Dis Ann Rheum Dis.* 2001;60(7):641–9.
 35. Wakefield RJ, Balint PV, Szkudlarek M, Filippucci E, Backhaus M, D'Agostino MA, Sanchez EN, Iagnocco A, Schmidt WA, Bruyn GA, Kane D, O'Connor PJ, Manger B, Joshua F, Koski J, Grassi W, Lassere MN, Swen N, Kainberger F, Klausner A, Ostergaard M, Brown AK, CPO 7 SIGroup. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *J Rheumatol.* 2006;33:440.
 36. Szkudlarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, Klarlund M, Thomsen HS, Østergaard M. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:955–62.
 37. Ramírez J, Ruiz-Esquide V, Pomés I, Celis R, Cuervo A, Hernández MVMV, et al. Patients with rheumatoid arthritis in clinical remission and ultrasound-defined active synovitis exhibit higher disease activity and increased serum levels of angiogenic biomarkers. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R5.
 38. DeLong E, DeLong D, Clarke-Pearson D. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988;44:837–45.
 39. Wang X, Wang H, Lv X, Wang X. Original article DMARDs combined with acupuncture therapy to treat RA: study of effects on dsDNA/NETs level and mechanism analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2020;13: 5059–67.
 40. Bach M, Moon J, Moore R, Pan T, Nelson JL, Lood C. A neutrophil activation biomarker panel in prognosis and monitoring of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72: 47–56.
 41. Ruiz-Limón P, Ortega R, Arias I, de la Rosa M, Abalos-Aguilera DC, Sanchez CP, Gomez YJ, et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res.* 2017;183:87–103.
 42. Fagerhol MK, Johnson E, Tangen J, Hollan I, Mir-lashari MR, Nissen-Meyer LSH, et al. NETs analysed by novel calprotectin-based assays in blood donors and patients with multiple myeloma or rheumatoid arthritis: a pilot study. *Scand J Immunol.* 2020;91(5): e12870.

43. Nakabo S, Ohmura K, Akizuki S, Murakami K, Nakashima R, Hashimoto M, et al. Activated neutrophil carbamylates albumin via the release of myeloperoxidase and reactive oxygen species regardless of NETosis. *Mod Rheumatol*. 2020;30:345–9.
44. O'Neil LJ, Barrera-Vargas A, Sandoval-Heglund D, Merayo-Chalico J, Aguirre-Aguilar E, Aponte AM, et al. Neutrophil-mediated carbamylation promotes articular damage in rheumatoid arthritis. *Sci Adv*. 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd2688>.
45. Trouw LA, Rispen T, Toes REM. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13:331–9.
46. Smolen JS, Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum*. 2011;63:43–52.
47. Frade-Sosa B, Ponce A, Ruiz-Esquide V, García-Yébenes MJ, Morlá R, Sapena N, et al. High sensitivity C reactive protein in patients with rheumatoid arthritis treated with antibodies against IL-6 or Jak inhibitors: a clinical and ultrasonographic study. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(1):182.
48. Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Habel H, Rudwaleit M, et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1–3.
49. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Cabrera-Villalba SR, et al. Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):275.
50. Sejersen K, Weitoft T, Knight A, Lysholm J, Larsson A, Rönnelid J. Serum calprotectin correlates stronger with inflammation and disease activity in ACPA positive than ACPA negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2023;4:kead641.

Discusión

Discusión

En los últimos años ha habido avances muy significativos en el manejo y estrategia de tratamiento en la AR, que han supuesto una mejora importante en el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de encontrar biomarcadores sólidos que nos permitan monitorizar de forma objetiva la actividad inflamatoria y la respuesta al tratamiento en los pacientes.

Las estrategias TTT promueven el ajuste del tratamiento hasta alcanzar el objetivo (remisión o baja actividad de la enfermedad), basado en la evaluación frecuente de la actividad de la enfermedad con índices articulares compuestos para los que se necesitan biomarcadores que permitan guiar las decisiones terapéuticas.

En la práctica clínica, los RFA clásicos (PCR y VSG), se utilizan para monitorizar la actividad de la AR. Sin embargo, estos RFA no siempre reflejan con precisión el grado de sinovitis, ya que pueden verse influenciados por diversos factores, incluyendo la terapia antirreumática utilizada. Esto es especialmente significativo en el caso de los pacientes que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi. En estos casos se ha cuestionado la utilidad de los RFA clásicos para la evaluación de la actividad de la AR.

Los anti-ril-6 producen una reducción de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda mediante la inhibición de los estímulos de la IL-6(11,214). Se ha observado que con tocilizumab, independientemente de la mejora de la actividad de la enfermedad, los niveles séricos de PCR disminuyen drásticamente(215). En cuanto a los JAKi, son una familia de terapias dirigidas que también tiene un impacto importante en los RFA (6,15,16). Por lo tanto, los niveles séricos de PCR, pero también de VSG, no deberían usarse como biomarcador de inflamación en estos pacientes, y se debería evitar los índices compuestos que los incluyen, como DAS28 o SDAI(10).

En este contexto, la presente Tesis Doctoral aborda esta necesidad, al presentar los resultados obtenidos del estudio de los biomarcadores de activación neutrofílica para el control de la actividad inflamatoria en pacientes con AR, especialmente en aquellos que utilizan tratamientos que inhibe la síntesis de proteínas de fase aguda de la respuesta inflamatoria sistémica, como son los JAKi y los anti-rIL-6.

El objetivo principal de nuestro trabajo fue evaluar dos marcadores de actividad de los neutrófilos en sangre periférica, la concentración de calprotectina plasmática y los niveles de NETs plasmáticos, como posibles biomarcadores de actividad inflamatoria en pacientes con AR. La calprotectina es una proteína liberada por los neutrófilos durante la actividad inflamatoria y sus niveles plasmáticos se han correlacionado con la gravedad de la inflamación(55). Por otro lado, se ha descrito que las NETs podrían jugar un papel en la respuesta inmune y se han asociado a la patogenia de varias enfermedades inmunomediadas, entre ellas la AR(42).

Para lograr este objetivo se emplearon una serie de estrategias integrales de evaluación, que incluyeron la medición de marcadores clínicos y de laboratorio, índices compuestos de actividad y, especialmente, el estudio ecográfico articular, utilizado este último como *gold-standard* para determinar la presencia de sinovitis.

La elección de los marcadores de activación neutrofílica se fundamenta en la creciente evidencia que respalda el papel crucial de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria de la AR (18). Numerosos estudios han demostrado que los neutrófilos no sólo están presentes en grandes cantidades en las articulaciones inflamadas, sino que también son actores clave en el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria de la AR(19). Dada su implicación en los procesos inflamatorios, la medición de la actividad neutrofílica a través de biomarcadores específicos, como la calprotectina y los NETs,

ofrece una oportunidad valiosa para obtener una evaluación más precisa de la actividad de la enfermedad. Esto es particularmente relevante en el contexto de pacientes que reciben terapias dirigidas, como FAMEb o JAKi.

En el primer trabajo, se realizó una evaluación de la precisión de la calprotectina plasmática en la detección de sinovitis mediante ecografía en pacientes con AR que recibían tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi. Nuestros resultados indican una asociación significativa entre los niveles de calprotectina plasmática y la presencia de sinovitis medida por ecografía. Se observó que la calprotectina mostraba una capacidad superior a la de los biomarcadores tradicionales, la PCR o la VSG, para detectar sinovitis ecográfica en pacientes con AR tratados con anti-rIL-6. Además, se encontró una correlación más estrecha entre los niveles de calprotectina plasmática y las puntuaciones ecográficas en pacientes que recibían tratamiento con JAKi en comparación con PCR y VSG.

En el segundo trabajo ampliamos el número de pacientes estudiados. Además, añadimos un grupo control de pacientes tratados con anti-TNF, donde la calprotectina ya había demostrado ser de utilidad para valorar la actividad inflamatoria (24,28). Nuestros resultados confirmaron nuevamente que la calprotectina es un buen biomarcador de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR, mostrando correlación con la actividad medida por parámetros clínicos y ecográficos. Además, encontramos que la calprotectina tenía una muy buena capacidad discriminatoria a la hora de detectar la presencia de sinovitis activa (medida por ecografía) a diferencia de la PCR o la VSG, cuya capacidad era sólo moderada. Estas diferencias se mantenían en los 3 grupos de tratamiento estudiados: tanto JAKi y anti-rIL-6 como el en el grupo control de anti-TNF.

Hasta donde sabemos, estos son los primeros estudios que evalúan el rendimiento de la calprotectina en sangre en pacientes con AR tratados con JAKi. Nuestros resultados muestran que en pacientes tratados con JAKi, la calprotectina plasmática es un buen biomarcador de actividad y que tiene una mayor correlación con la sinovitis por ecografía que la PCR.

En cuanto a los pacientes tratados con anti-rIL-6, sólo la calprotectina fue un biomarcador de sinovitis ecográfica, a diferencia de la PCR y VSG que no mostraron la misma relevancia en estos pacientes.

En consecuencia, nuestros hallazgos respaldan que la calprotectina plasmática puede considerarse un biomarcador sensible de la inflamación sinovial en pacientes con AR tratados con anti-rIL-6 o JAKi. Es un biomarcador prometedor con un uso potencial en el seguimiento de pacientes, especialmente aquellos que reciben tratamientos que modifican los niveles de RFA clásicos, como los anti-rIL-6 o JAKi (11,12). Nuestros resultados están en línea con la bibliografía existente. Estudios previos han indicado que esta proteína refleja el estado clínico del paciente de manera más precisa que los RFA clásicos (24,144,216). Además, la calprotectina sirve como un biomarcador pronóstico de la progresión radiográfica (217) y es un marcador de respuesta terapéutica a FAMES específicos (27).

La ecografía es una técnica de imagen muy sensible para detectar sinovitis activa en pacientes con AR, siendo más sensible que la exploración física. Nuestros resultados confirman la asociación de la calprotectina con la sinovitis medida por ecografía en la AR, como se ha documentado en otros estudios (28,152–154). Previamente se había demostrado que en pacientes que reciben anti-TNF, la calprotectina es un buen biomarcador de sinovitis ecográfica, incluso en pacientes en

remisión o con baja actividad de la enfermedad (28). Hemos replicado estos hallazgos por primera vez en pacientes con AR tratados con anti-rIL-6 y JAKi, la mayoría de los cuales estaban en remisión o con baja actividad.

El otro parámetro analizado fue los remanentes de las NETs en plasma. La medición de NETs es una tendencia emergente en los últimos años. Para la realización de esta Tesis Doctoral se determinaron los remanentes de los NETs por primera vez en nuestro hospital. Para esto utilizamos un ELISA desarrollado específicamente en el laboratorio de inmunología de nuestro centro.

Estudiamos las NETs en el grupo de pacientes tratados con JAKi o anti-rIL-6 e incluimos tres grupos control: un grupo de pacientes tratados con anti-TNF, un grupo control positivo de pacientes que definimos como muy activos (pacientes con al menos 4 articulaciones inflamadas, independientemente del tipo de tratamiento que estuvieran recibiendo) y otro grupo control negativo en el que incluimos sujetos sanos.

Nuestros hallazgos demostraron que los niveles plasmáticos de NETs no reflejaban el estado inflamatorio de la enfermedad, independientemente del grupo de terapia específica analizada. Además, estudiamos la posible relación entre los remanentes de NET y la sinovitis detectada por ecografía, pero tampoco observamos una asociación significativa. Estos resultados coinciden con estudios previos que tampoco encontraron una asociación significativa entre los niveles de NETs en sangre periférica y la actividad de la enfermedad (33,88,209). Sin embargo, otros trabajos sí que han mostrado una asociación con la actividad clínica de la enfermedad. No obstante, cabe destacar que estos estudios son muy heterogéneos, utilizando diferentes métodos para la detección de las NETs, con un número limitado de pacientes, y en los que las

asociaciones descritas son débiles y sólo con unos pocos de los parámetros de actividad analizados (31,200,205,206,208,213).

La falta de correlación entre las NETs y la actividad inflamatoria de la enfermedad en nuestra cohorte puede atribuirse a la inclusión de pacientes sometidos a tratamiento biológico o JAKi con baja actividad de la enfermedad. Sin embargo, incluso en nuestro grupo de control, compuesto por pacientes con alta actividad de la enfermedad, los niveles de NET estaban sólo ligeramente elevados y no hubo diferencias significativas en comparación con el grupo principal. Estos hallazgos indican que los remanentes de las NETs no podrían considerarse biomarcadores fiables de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR, particularmente aquellos que reciben tratamiento dirigido. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los bajos niveles observados de NETs en nuestros pacientes pueden estar influenciados por el efecto de los tratamientos biológicos o JAKi, ya que investigaciones previas han reportado reducciones en la formación de NET después de diferentes tratamientos con FAMEb (206,213).

Como objetivo secundario de la tesis se quiso analizar la asociación entre los marcadores de activación de los neutrófilos y los anticuerpos característicos de la AR: FR, ACPA y anti-CarP.

Se ha sugerido que las NETs participan en la patogenia de la AR y su potencial como fuente antigénica y autoanticuerpos (32,185,186). En este trabajo medimos simultáneamente los niveles de RF, ACPAs y anticuerpos anti-CarP en las mismas muestras de sangre utilizadas para analizar los niveles de las NETs. En este caso, no encontramos ninguna correlación entre los títulos de autoanticuerpos y los niveles de NETs en sangre periférica. Creemos que los bajos niveles de NETs junto con el efecto de

la terapia biológica pueden afectar la posible relación entre los niveles de anticuerpos y los remanentes de NETs en nuestra cohorte. Previamente se había descrito una asociación entre los títulos de ACPA y los remanentes séricos de las NETs en AR, pero sólo en aquellos pacientes con niveles muy altos de ACPA (218). Las discrepancias observadas entre esos hallazgos y nuestro estudio pueden atribuirse a factores como el origen geográfico, la duración de la enfermedad, problemas metodológicos en la determinación de las NETs o diferencias en las terapias medicamentosas entre las poblaciones estudiadas.

La falta de asociación entre los remanentes plasmáticos de las NETs y los niveles de autoanticuerpos en nuestro estudio no descarta un papel de las NETs en la producción de autoanticuerpos en la AR como consecuencia de una mayor exposición antigénica. Varios trabajos in vitro corroboran el papel de las NETs en la producción de autoanticuerpos y la idea de que los autoanticuerpos estimulan a los neutrófilos para formar NETs (32,185,186). Los estudios in vitro también han encontrado que los neutrófilos de pacientes con AR muestran mayor formación espontánea de NETs, que se correlaciona con los niveles de ACPA (32,33). Las NETs también se han descrito como una fuente importante de proteínas carbamyladas en pacientes con AR (169). Los anticuerpos anti-CarP están presentes con frecuencia en la AR y se asocian con formas más graves de la enfermedad y con un aumento de la morbi-mortalidad(196,197). Se ha sugerido que estos anticuerpos pueden activar osteoclastos y contribuir a la resorción ósea, lo que sugiere una relación causal con el daño óseo en la AR (169).

Todavía es necesario investigar más sobre los tipos específicos de NETs involucrados en la patogenia de la AR. Comprender la heterogeneidad de las NETs y su

contribución en los procesos de enfermedad es crucial si queremos obtener una comprensión más profunda de los mecanismos complejos de la AR.

En lo que respecta a la relación entre la calprotectina y los autoanticuerpos, analizamos si existía diferencia en cuanto a la capacidad discriminatoria de la calprotectina para detectar sinovitis en pacientes seropositivos vs seronegativos. Este análisis reveló una notable correlación entre la calprotectina y los parámetros clínicos en pacientes con AR que son ACPA-positivos, pero no en pacientes que son ACPA-negativos. Sin embargo, es interesante destacar que no observamos diferencias significativas en los parámetros ecográficos. Es importante tener en cuenta que el tamaño de muestra en el subgrupo seronegativo en nuestra cohorte fue pequeño. Estos resultados están en concordancia con lo publicado previamente en la bibliografía, donde se ha descrito que existe una asociación entre la calprotectina circulante y la inflamación en pacientes que son ACPA positivos, pero no en pacientes con AR que son ACPA negativos (142). Con el FR no encontramos ninguna diferencia.

Nuestro trabajo tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral de los pacientes incluidos, que fue relativamente pequeño, especialmente de pacientes tratados con JAKi. Además, los pacientes estaban predominantemente en remisión o con baja actividad de la enfermedad. Otra limitación de nuestro estudio fue su diseño transversal, lo que limita nuestra capacidad para establecer causalidad y observar cambios en los niveles de NETs y calprotectina con el tiempo.

Sin embargo, incluso en este contexto, la calprotectina mostró una buena capacidad discriminatoria para la sinovitis detectada por ecografía. Dado el papel crucial de la calprotectina en la fisiopatología tanto de la inflamación aguda como crónica, sus niveles en sangre podrían constituir un marcador potencial de la actividad de la

enfermedad en la AR. Cada vez hay más evidencia que respalda la idea de que la calprotectina estratifica con mayor precisión la actividad de la enfermedad en comparación con la PCR y la VSG. Además, datos recientes han demostrado que los niveles de calprotectina podrían servir como una herramienta útil para monitorizar la actividad de la enfermedad y la respuesta terapéutica en pacientes que reciben terapia biológica o JAKi.

No obstante, se requieren estudios más amplios y la estandarización de los ensayos en pacientes con AR para determinar el verdadero potencial de la calprotectina como biomarcador para la monitorización de la actividad de la enfermedad o la respuesta al tratamiento en la práctica clínica, de manera similar a lo que ocurre con la calprotectina fecal en la EII. Las futuras aplicaciones podrían incluir objetivos terapéuticos potenciales, la predicción de la respuesta al tratamiento o la titulación de dosis de biológicos en un enfoque de medicina personalizada.

En lo que respecta a la determinación de las NETs, cabe destacar que la metodología utilizada para evaluarlas se basó en un método indirecto, un ELISA que detecta proteínas expresadas en las NETs, pero que no son exclusivas de estas estructuras (202). Este enfoque indirecto puede haber introducido variabilidad y sesgo potencial en los resultados. Además, la cohorte de pacientes en nuestro estudio consistió en individuos con AR de larga duración que estaban recibiendo terapias dirigidas (FAMEb o JAKi). Estos tratamientos pueden influir en los niveles de NETs, lo que potencialmente conduciría a niveles más bajos que los observados en pacientes que nunca han recibido tratamiento. Es esencial reconocer el potencial efecto de los medicamentos en los niveles de las NETs y considerar estudiar pacientes en diferentes etapas de la enfermedad para comprender mejor la dinámica de las NET en la AR.

También existen varias limitaciones al comparar nuestros resultados con otros estudios sobre NETs como marcador de actividad de la AR. Para empezar, la variabilidad en los métodos de medición que se utilizan en los estudios. Aunque existen recomendaciones (219), no contamos con un método estandarizado para la medición de las NETs. Es por este motivo por el cual en los diferentes trabajos de investigación no existe homogeneidad, dificultando su comparación. Por otro lado, el estudio en sangre periférica de la NETosis con la cuantificación de los restos de las NETs, utilizando diferentes complejos proteicos es complicada, además de un método de valoración indirecto. Se suma a lo anterior que los complejos proteicos que se utilizan para medir las NETs pueden no ser específicos de los productos de la NETosis, pudiendo dar lugar a falsos positivos o falsos negativos (202).

También hay que tener en cuenta que los neutrófilos son células altamente activas y sensibles a estímulos externos, y la manipulación de la sangre durante la obtención y el procesamiento de la muestra puede desencadenar su activación y la generación de NETs. La generación espontánea de NET durante la obtención y procesamiento de la muestra puede resultar en una sobrestimación de los niveles de NETs en la sangre periférica y, por lo tanto, en una interpretación errónea de los resultados.

Otra de las limitaciones es el pequeño tamaño muestral de algunos estudios, limitando la capacidad para generalizar los resultados a la población. Además, las poblaciones incluidas en los trabajos previos eran muy heterogéneas con diferencias en el tipo de AR, tiempo de evolución y gravedad de la enfermedad o el tratamiento previamente recibido, entre otros; lo que puede afectar los resultados. Son necesarios más estudios en poblaciones específicas prestando especial atención, en nuestra

opinión, a los tratamientos previamente recibidos por los pacientes. En vista de los resultados observados creemos que los fármacos biológicos pueden jugar un papel relevante en la NETosis.

Conclusión

Conclusión

1. Los resultados de nuestro estudio respaldan la importancia de la calprotectina como un biomarcador clave para evaluar la actividad de la enfermedad en pacientes con AR. La medición de la calprotectina representaría una herramienta crucial que permite una evaluación más precisa de la actividad inflamatoria, tanto desde el punto de vista clínico como ecográfico.
2. Para la evaluación de pacientes con AR que reciben tratamiento con anti-rIL-6 o JAKi, que inhiben la producción de RFA clásicos, la determinación de los niveles de calprotectina es especialmente útil. Tiene una muy buena capacidad discriminatoria a la hora de detectar la presencia de sinovitis, a diferencia de la PCR o la VSG. Nuestros resultados subrayan la utilidad clínica potencial de la calprotectina en este contexto terapéutico específico.
3. En base a los resultados de este estudio, no podemos abogar por la medición clínica de rutina de las NETs para monitorizar la actividad de la enfermedad. No hemos encontrado correlación entre los niveles de productos derivados de las NETs en sangre periférica y la actividad de la enfermedad, ni clínica ni ecográfica.
4. A pesar de que se ha sugerido la participación de las NETs en la patogenia de la AR y su potencial como fuente antigénica y autoanticuerpos, en nuestro trabajo no encontramos ninguna correlación entre los títulos de autoanticuerpos (FR, ACPA y anti-CarP) y los niveles de NETs en sangre periférica. Creemos que los bajos niveles de NETs junto con el efecto de la terapia biológica pueden afectar la posible relación entre los niveles de anticuerpos y los remanentes de las NETs en nuestra cohorte.

5. La presente Tesis Doctoral constituye una nueva contribución al campo de la investigación sobre el papel de los niveles de NETS y su posible relación con la actividad de la actividad de la enfermedad y los autoanticuerpos en la AR.

Bibliografía

Bibliografía

1. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020 Jun;110:102400.
2. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Feb 8;4:18001.
3. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA.* 2018 Oct 2;320(13):1360–72.
4. Smolen JS, Landewé RBM, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis.* 2023 Jan;82(1):3–18.
5. Navarro G, Taroumian S, Barroso N, Duan L, Furst D. Tocilizumab in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums. *Semin Arthritis Rheum.* 2014 Feb;43(4):458–69.
6. Taylor PC. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019 Feb 1;58(Suppl 1):i17–26.
7. Prevoo MLL, Van't Hof MA, Kuper HH, Van Leeuwen MA, Van De Putte LBA, Van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan 1;38(1):44–8.
8. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Feb 1;42(2):244–57.
9. Aletaha D, Smolen JS. The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006 Feb;32(1):9-44, vii.
10. Nash P, Kerschbaumer A, Dörner T, Dougados M, Fleischmann RM, Geissler K, et al. Points to consider for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases with Janus kinase inhibitors: a consensus statement. *Ann Rheum Dis.* 2021 Jan;80(1):71–87.
11. Smolen JS, Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum.* 2011 Jan;63(1):43-52.

12. Frade-Sosa B, Ponce A, Ruiz-Esquide V, García-Yébenes MJ, Morlá R, Sapena N, et al. High Sensitivity C Reactive Protein in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Antibodies against IL-6 or Jak Inhibitors: A Clinical and Ultrasonographic Study. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jan 13;12(1):182.
13. Keystone EC, Taylor PC, Drescher E, Schlichting DE, Beattie SD, Berclaz PY, et al. Safety and efficacy of baricitinib at 24 weeks in patients with rheumatoid arthritis who have had an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2015 Feb;74(2):333-40.
14. Kremer JM, Cohen S, Wilkinson BE, Connell CA, French JL, Gomez-Reino J, et al. A phase IIb dose-ranging study of the oral JAK inhibitor tofacitinib (CP-690,550) versus placebo in combination with background methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate alone. *Arthritis Rheum*. 2012 Apr;64(4):970-81.
15. Pan YJ, Su KY, Shen CL, Wu YF. Correlation of Hematological Indices and Acute-Phase Reactants in Rheumatoid Arthritis Patients on Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: A Retrospective Cohort Analysis. *J Clin Med*. 2023 Dec 11;12(24):7611.
16. Aletaha D, Smolen JS. Remission in rheumatoid arthritis: missing objectives by using inadequate DAS28 targets. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Nov 19;15(11):633-4.
17. Jung N, Bueb JL, Tolle F, Bréchar S. Regulation of neutrophil pro-inflammatory functions sheds new light on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jul 1;165:170-80.
18. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegatti E, Roccatello D, Collantes-Estevez E, Lopez-Pedraza C, et al. Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. *Autoimmun Rev*. 2018 Nov;17(11):1138-1149.
19. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Oct;10(10):593-601.
20. Zhang L, Yuan Y, Xu Q, Jiang Z, Chu CQ. Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Biomed Res*. 2019 Oct 24;34(2):86-93.
21. Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther*. 2016 Nov;167:120-131.
22. Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK, Berntzen HB, Munthe E FMK. A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1989 Nov;16(11):1416-20.

23. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1093-7.
24. Inciarte-Mundo J, Victoria Hernández M, Ruiz-Esquide V, Raquel Cabrera-Villalba S, Ramirez J, Cuervo A, et al. Serum Calprotectin Versus Acute-Phase Reactants in the Discrimination of Inflammatory Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016 Jul;68(7):899-906.
25. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Cabrera-Villalba SR, et al. Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2018 Dec 13;20(1):275.
26. Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(1):150-4.
27. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Foell D, Vogl T, Roth J, Tak PP, Holzinger D. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):499-505.
28. Inciarte-Mundo J, Ramirez J, Hernández MV, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Cabrera-Villalba SR, et al. Calprotectin and TNF trough serum levels identify power Doppler ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients in remission or with low disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2016 Jul 8;18(1):160.
29. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Aug;14(8):467-475.
30. 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 Jun 13;16(3):R122.
31. Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Jiménez-Gómez Y, Arias-de la Rosa I, Ábalos-Aguilera MC, et al. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity,

- atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun.* 2017 Aug;82:31-40.
32. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013 Mar 27;5(178):178ra40.
 33. Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2018 Feb;21(2):415-421.
 34. de Bont CM, Stokman MEM, Faas P, Thurlings RM, Boelens WC, Wright HL, et al. Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020 Sep;113:102484.
 35. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1223-1248.
 36. Cross A, Barnes T, Bucknall RC, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J Leukoc Biol.* 2006 Jun 22;80(3):521-8.
 37. Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, Edwards SW. RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways following Neutrophil Priming. *PLoS One.* 2013 Mar 6;8(3):e58598.
 38. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 1999;73:369-509.
 39. Fu X, Liu H, Huang G, Dai SS. The emerging role of neutrophils in autoimmune-associated disorders: effector, predictor, and therapeutic targets. *MedComm (2020).* 2021 Jul 22;2(3):402-413.
 40. Karmakar U, Vermeren S. Crosstalk between B cells and neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology.* 2021 Dec;164(4):689-700.
 41. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
 42. Frade-Sosa B, Sanmartí R. Neutrophils, neutrophil extracellular traps, and rheumatoid arthritis: An updated review for clinicians. *Reumatología Clínica (English Edition).* 2023 Nov;19(9):515-26.

43. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26915-21.
44. Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *Lancet*. 2013 Aug 31;382(9894):797-808.
45. Diamond B, Bluestone J, Wofsy D. The immune tolerance network and rheumatic disease: immune tolerance comes to the clinic. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1730-5.
46. Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol*. 2021 Mar 4;12:649693.
47. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9813-8.
48. Chen JQ, Papp G, Szodoray P, Zeher M. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2016 Dec;15(12):1171-1180.
49. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836-45.
50. Tanaka D, Kagari T, Doi H, Shimozato T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology*. 2006 Oct;119(2):195-202.
51. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Sep;49(9):1618-31.
52. Assi LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M, et al. Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1776-86.
53. Barbarroja N, Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limon P, Castro-Villegas C, Aguirre MA, Carretero R, et al. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Dec;34(12):2706-16.

54. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014 Jul;233(3):294-307.
55. Inciarte-Mundo J, Frade-Sosa B, Sanmartí R. From bench to bedside: Calprotectin (S100A8/S100A9) as a biomarker in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2022 Nov 3;13.
56. Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, Abdollahi-Roodsaz S, Sloetjes AW, Leenen PJM, et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1365–75.
57. Iotzova-Weiss G, Dziunycz PJ, Freiburger SN, Läuchli S, Hafner J, Vogl T, et al. S100A8/A9 stimulates keratinocyte proliferation in the development of squamous cell carcinoma of the skin via the receptor for advanced glycation-end products. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120971.
58. Hessian P a, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*. 1993;53(2):197–204.
59. Fagerhol MK, Dale I AT. Release and quantitation of a leukocyte derived protein (L1). *Scand J Haematol*. 1980;24:393–8.
60. Wilson GB, Jahn TL, Fonseca JR. Demonstration of serum protein differences in cystic fibrosis by isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gels. *Clin Chim Acta*. 1973 Nov 23;49(1):79-91.
61. Wilkinson MM, Busuttil A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci*. 1988 Oct;91 (Pt 2):221-30.
62. Dorin JR, Novak M, Hill RE, Brock DJ, Secher DS, van Heyningen V. A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. *Nature*. 1987 Apr 9-15;326(6113):614-7.
63. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, et al R. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2013 Nov;17(55):xv-xix, 1-211.

64. Yang Z, Clark N, Park KT. Effectiveness and cost-effectiveness of measuring fecal calprotectin in diagnosis of inflammatory bowel disease in adults and children. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Feb;12(2):253-62.e2.
65. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Dec;18(12):2218-24.
66. Khaki-Khatibi F, Qujeq D, Kashifard M, Moein S, Maniati M, Vaghari-Tabari M. Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta*. 2020 Nov;510:556-565.
67. Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol*. 2015 Mar;110(3):444-54.
68. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Médecis R, Lussier A, Poubelle PE, et al. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug;48(8):2310-20.
69. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003 Mar 15;170(6):3233-42.
70. Newton RA, Hogg N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol*. 1998 Feb;160(3):1427-35.
71. Malemud CJ. Myeloid-related protein activity in rheumatoid arthritis. *Int J Inflamm*. 2011;2011:580295.
72. Malemud C, Pearlman E. Targeting JAK/STAT Signaling Pathway in Inflammatory Diseases. *Curr Signal Transduct Ther*. 2009 Sep;4(3):201-21.
73. Roth J, Burwinkel F, van den Bos C, Goebeler M, Vollmer E, Sorg C. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood*. 1993 Sep 15;82(6):1875-83.
74. Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002 May 1;7:d1356-68.

75. Dorin JR, Emslie E, van Heyningen V. Related calcium-binding proteins map to the same subregion of chromosome 1q and to an extended region of synteny on mouse chromosome 3. *Genomics*. 1990;8(3):420–6.
76. Lagasse E. Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol*. 1988;8(6):2402–10.
77. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):4260-8.
78. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2955-62.
79. Srikrishna G, Panneerselvam K, Westphal V, Abraham V, Varki A, Freeze HH. Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4678-88.
80. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007 Sep;13(9):1042-9.
81. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2010 Nov;12(12–13):928–36.
82. Goebeler M, Roth J, Van Den Bos C, Ader G, Sorg C. Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem J*. 1995;309(2):419–24.
83. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol*. 2003 Apr 1;24(4):155–8.
84. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987–95.
85. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008 Feb 15;319(5865):962-5.

86. Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, et al. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*. 2011 Aug 18;10(2):158-64.
87. Austermann J, Spiekermann C, Roth J. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Sep;14(9):528-541.
88. Bach M, Moon J, Moore R, Pan T, Nelson JL, Lood C. A Neutrophil Activation Biomarker Panel in Prognosis and Monitoring of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Jan;72(1):47-56.
89. Bae SC, Lee YH. Calprotectin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Postgrad Med*. 2017 Jun;129(5):531-537.
90. Yanping Wang YL. Clinical significance of serum calprotectin level for the disease activity in active rheumatoid arthritis with normal C-reactive protein. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;1(12(3)):1009-1014.
91. Van Hoovels L, Vander Cruyssen B, Bogaert L, Van den Breemt S, Bossuyt X. Pre-analytical and analytical confounders of serum calprotectin as a biomarker in rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*. 2019 Dec 18;58(1):40-49.
92. Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul 26;13(4):R122.
93. Meuwis MA, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, Piver E, et al. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec;7(12):e678-83.
94. Pedersen L, Nybo M, Poulsen MK, Henriksen JE, Dahl J, Rasmussen LM. Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014 Dec 19;14:196.
95. Bressler B, Panaccione R, Fedorak RN, Seidman EG. Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2015;29(7):369–72.
96. Wollmer M, Wändell P, Rosenqvist M, Larsson A, Melander O, Wessman T, Ärnlov J, Ruge T. Plasma calprotectin in the emergency department: a potential clinical biomarker for patients with infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest*. 2021 Nov;81(7):593-597.

97. Havelka A, Sejersen K, Venge P, Pauksens K, Larsson A. Calprotectin, a new biomarker for diagnosis of acute respiratory infections. *Sci Rep*. 2020 Mar 6;10(1):4208.
98. Resende LO, Jorge MFS, Schmitt JV. Extensive pyoderma gangrenosum-like lesions revealing a case of hyperzincemia and hypercalprotectinemia: when to suspect it? *An Bras Dermatol*. 2019 Nov-Dec;94(6):713-716.
99. Frade-Sosa B, Chacur CA, Augé JM, Ponce A, Sarmiento-Monroy JC, Azuaga AB, et al. Calprotectin in Patients with Rheumatic Immunomediated Adverse Effects Induced by Checkpoints Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2023 May 30;15(11):2984.
100. Hammer HB, Kvien TK, Glennås A MK. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13(1):59–64.
101. Hu H, Du F, Zhang S, Zhang W. 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 Sep 3;29(5):836–42.
102. Gupta L, Bhattacharya S, Agarwal V, Aggarwal A. Elevated levels of serum MRP8/14 in ankylosing spondylitis: associated with peripheral arthritis and active disease. *Clin Rheumatol*. 2016 Dec 1;35(12):3075–9.
103. Turina MC, Yeremenko N, Paramarta JE, De Rycke L, Baeten D. Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4).
104. Sokolova MV, Simon D, Nas K, Zaiss MM, Luo Y, Zhao Y, et al. A set of serum markers detecting systemic inflammation in psoriatic skin, entheses, and joint disease in the absence of C-reactive protein and its link to clinical disease manifestations. *Arthritis Res Ther*. 2020 Feb 12;22(1):26.
105. Hansson C, Eriksson C, Alenius GM. S-calprotectin (S100A8/S100A9): a potential marker of inflammation in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol Res*. 2014;2014:696415.
106. Holzinger D, Frosch M, Kastrup A, Prince FH, Otten MH, Van Suijlekom-Smit LW, et al. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):974-80.

107. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, Wulffraat N, Kuis W, Viemann D, et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Sep 1;48(9):2622–6.
108. Mitrovic S, Fautrel B. New Markers for Adult-Onset Still's Disease. *Joint Bone Spine.* 2018 May;85(3):285-293.
109. Jung JY, Suh CH, Kim HA. The role of damage-associated molecular pattern for pathogenesis and biomarkers in adult-onset Still's disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019 Jun 3;19(6):459–68.
110. Holzinger D, Nippe N, Vogl T, Marketon K, Mysore V, Weinhage T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(5):1327–39.
111. Turnier JL, Fall N, Thornton S, Witte D, Bennett MR, Appenzeller S, et al. Urine S100 proteins as potential biomarkers of lupus nephritis activity. *Arthritis Res Ther.* 2017 Oct 24;19(1):242.
112. Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GRV. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus.* 1993;2(1):47–50.
113. Cuida M, Brun JG, Johannessen AC, Jonsson R. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrates in Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis and osteoarthritis with special reference to calprotectin-producing cells. *APMIS.* 1996 Dec;104(12):881-90.
114. Nordal HH, Brun JG, Halse AK, Madland TM, Fagerhol MK, Jonsson R. Calprotectin (S100A8/A9), S100A12, and EDTA-resistant S100A12 complexes (ERAC) in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2014;43(1):76-8.
115. Xu X, Wu WY, Tu WZ, Chu HY, Zhu XX, Liang MR, et al. Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities. *Clin Rheumatol.* 2013 Oct;32(10):1501-10.
116. Hesselstrand R, Wildt M, Bozovic G, Andersson-Sjöland A, Andréasson K, Scheja A, et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis. *Respir Med.* 2013 Jul;107(7):1079–86.

117. Van Bon L, Cossu M, Loof A, Gohar F, Wittkowski H, Vonk M, et al. Proteomic analysis of plasma identifies the Toll-like receptor agonists S100A8/A9 as a novel possible marker for systemic sclerosis phenotype. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(8):1585–9.
118. Torgutalp M, Dincer ABK, Yayla EM, Yurteri EU, Okatan EI, Guloksuz GEA, et al. THU0610 Serum calprotectin levels in behçet’s disease: relationships between disease activity and clinical parameters. *Ann Rheum Dis*. 2018 Jun 1;77(Suppl 2):504–504.
119. Nistala K, Varsani H, Wittkowski H, Vogl T, Krol P, Shah V, et al. Myeloid related protein induces muscle derived inflammatory mediators in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2013 Sep 23;15(5):R131.
120. Seeliger S, Vogl T, Engels IH, Schröder JM, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases. *Am J Pathol*. 2003 Sep;163(3):947-56.
121. Youssef PP, Smeets TJ, Bresnihan B, Cunnane G, Fitzgerald O, Breedveld F, et al. Microscopic measurement of cellular infiltration in the rheumatoid arthritis synovial membrane: a comparison of semiquantitative and quantitative analysis. *Br J Rheumatol*. 1998;37(9):1003–7.
122. van Lent PLEM, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Dec 1;67(12):1750–8.
123. Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, Abdollahi-Roodsaz S, Sloetjes AW, Leenen PJM, et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: Implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 May 27;63(5):1365–75.
124. Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, et al. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Journal of Rheumatology*. 1999 Dec;26(12):2523–8.
125. Wang Q, Chen W, Lin J. The role of calprotectin in rheumatoid arthritis. *J Transl Int Med*. 2019 Dec 1;7(4):126–31.
126. Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LAB, Roth J, et al. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1??, and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis:

- Rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2329–39.
127. Jonsson MK, Sundlisæter NP, Nordal HH, Hammer HB, Aga AB, Olsen IC, et al. Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Dec;76(12):2031-2037.
 128. Ramírez J, Narváez JA, Ruiz-Esquide V, Hernández-Gañán J, Cuervo A, Inciarte-Mundo J, et al. Clinical and sonographic biomarkers of structural damage progression in RA patients in clinical remission: A prospective study with 12 months follow-up. *Semin Arthritis Rheum.* 2017 Dec 1;47(3):303–9.
 129. Berntzen HB, Ölmez Ü, Fagerhol MK, Munthe E. The Leukocyte Protein L1 in Plasma and Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Scand J Rheumatol.* 1991 Jan 12;20(2):74–82.
 130. Uchida T, Fukawa A, Uchida M, Fujita K, Saito K. Application of a novel protein biochip technology for detection and identification of rheumatoid arthritis biomarkers in synovial fluid. *J Proteome Res.* 1(6):495–9.
 131. Dale I. Plasma levels of the calcium-binding LI leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990 Jan 8;50(8):837–41.
 132. Naess-Andresen CF, Egelanddal B, Fagerhol MK. Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *Molecular Pathology.* 1995 Oct 1;48(5):M278–84.
 133. Nordal HH, Fagerhol MK, Halse AK, Hammer HB. Calprotectin (S100A8/A9) should preferably be measured in EDTA-plasma; results from a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2018 Feb-Apr;78(1-2):102-108.
 134. Baillet A. Protéines S100A8, S100A9 et S100A12 : marqueurs inflammatoires ou acteurs physiopathologiques de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue de Medecine Interne.* 2010;31(6):458–61.
 135. Baillet A, Trocmé C, Berthier S, Arlotto M, Grange L, Chenau J, et al. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(4):671–82.

136. Brun JG, Haga HJ, Bøe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB, et al. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol*. 1992 Jun;19(6):859–62.
137. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 1994 Apr;21(4):733–8.
138. De Seny D, Fillet M, Ribbens C, Marée R, Meuwis MA, Lutteri L, et al. Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem*. 2008;54(6):1066–75.
139. García-Arias M, Pascual-Salcedo D, Ramiro S, Ueberschlag ME, Jermann TM, Cara C, et al. Calprotectin in rheumatoid arthritis: association with disease activity in a cross-sectional and a longitudinal cohort. *Mol Diagn Ther*. 2013;17(1):49–56.
140. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R39
141. Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. The major leukocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1988;76:251–6.
142. Sejersen K, Weitoft T, Knight A, Lysholm J, Larsson A, Rönnelid J. Serum calprotectin correlates more strongly with inflammation and disease activity in ACPA positive than ACPA negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2023 Dec 4:kead641.
143. Bisoendial RJ, Stroes ESG, Tak PP. Critical determinants of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2011;17(1):21–6.
144. Inciarte-Mundo J, Ruiz-Esquide V, Hernández MV, Cañete JD, Cabrera-Villalba SR, Ramirez J, et al. Calprotectin more accurately discriminates the disease status of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab than acute phase reactants. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Dec;54(12):2239-43.
145. Hurnakova J, Hulejova H, Zavada J, Hanova P, Komarc M, Mann H, et al. Relationship between serum calprotectin (S100A8/9) and clinical, laboratory and ultrasound parameters of disease activity in rheumatoid arthritis: A large cohort study. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12(8).

146. Mansour HE, Abdullrhman MA, Mobasher SA, El Mallah R, Abaza N, Hamed F, et al. Serum Calprotectin in Rheumatoid Arthritis: A Promising Diagnostic Marker, How Far Is It Related to Activity and Sonographic Findings? *J Med Ultrasound*. 2017 Jan-Mar;25(1):40-46.
147. Jarlborg M, Courvoisier DS, Lamacchia C, Martinez Prat L, Mahler M, Bentow C, et al. Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2020 May 6;22(1):105.
148. Aghdashi MA, Seyedmardani S, Ghasemi S, Khodamoradi Z. Evaluation of Serum Calprotectin Level and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rev*. 2019;15(4):316-320.
149. Tweehuysen L, den Broeder N, van Herwaarden N, Joosten LAB, van Lent PL, Vogl T, et al. Predictive value of serum calprotectin (S100A8/A9) for clinical response after starting or tapering anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *RMD Open*. 2018 Apr 9;4(1):e000654.
150. de Moel EC, Rech J, Mahler M, Roth J, Vogl T, Schouffoer A, et al. Circulating calprotectin (S100A8/A9) is higher in rheumatoid arthritis patients that relapse within 12 months of tapering anti-rheumatic drugs. *Arthritis Res Ther*. 2019 Dec 5;21(1):268.
151. Joshua F, Edmonds J, Lassere M. Power Doppler ultrasound in musculoskeletal disease: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Oct;36(2):99–108.
152. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, Hulejova H, Klein M, Mann H, et al. Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:252.
153. Hammer HB, Fagerhol MK, Wien TN, Kvien TK. The soluble biomarker calprotectin (a S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res Ther*. 2011 Oct 26;13(5).
154. Nordal HH, Brokstad KA, Solheim M, Halse AK, Kvien TK, Hammer HB. Calprotectin (S100A8/A9) has the strongest association with ultrasound-detected synovitis and predicts response to biologic treatment: results from a longitudinal study of patients with established rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017 Jan 12;19(1):3.
155. Bernardy C, Lejeune S, Courtier A, Wendling D, Berenbaum F, Nguyen MVC, Gaudin P, Paclet MH, Baillet A. Calprotectin alone is not sufficient to predict response to

- methotrexate in early ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis: Analysis of the ESPOIR cohort. *Joint Bone Spine*. 2020 Jan;87(1):99-100.
156. Nair SC, Welsing PMJ, Choi IYK, Roth J, Holzinger D, Bijlsma JWJ, et al. A Personalized Approach to Biological Therapy Using Prediction of Clinical Response Based on MRP8/14 Serum Complex Levels in Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS One*. 2016 Mar 1;11(3).
 157. Martínez-Feito A, Plasencia-Rodríguez C, Navarro-Compán V, Jochems A, Hernández-Breijo B, Peiteado D, et al. Low serum calprotectin levels correlate with the presence of biological drugs after the first year of treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2019 Nov;79(7):538-540.
 158. Abildtrup M, Kingsley GH, Scott DL. Calprotectin as a biomarker for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*. 2015;42(5):760–70.
 159. Wang W, Su J, Kang W, Yan M, Pan J, Zhang X. Neutrophil extracellular traps in autoimmune diseases: Analysis of the knowledge map. *Front Immunol*. 2023 Jan 27;14.
 160. Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2023 May;23(5):274-288.
 161. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017 Jun 2;6:e24437.
 162. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010 Nov 1;191(3):677-91.
 163. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol*. 2013 Jan 11;3:420.
 164. Zhao J, Jiang P, Guo S, Schrodi SJ, He D. Apoptosis, Autophagy, NETosis, Necroptosis, and Pyroptosis Mediated Programmed Cell Death as Targets for Innovative Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2021 Dec 24;12:809806.
 165. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb 9;18(2):134–47.
 166. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014 May 28;20(5):511–7.

167. Herrada AA, Escobedo N, Iruretagoyena M, Valenzuela RA, Burgos PI, Cuitino L, et al. Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2019 Apr 15;10:772.
168. Barrat FJ, Crow MK, Ivashkiv LB. Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease. *Nat Immunol.* 2019 Dec;20(12):1574-1583.
169. O'Neil LJ, Barrera-Vargas A, Sandoval-Heglund D, Merayo-Chalico J, Aguirre-Aguilar E, Aponte AM, et al. Neutrophil-mediated carbamylation promotes articular damage in rheumatoid arthritis. *Sci Adv.* 2020 Oct 30;6(44).
170. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS One.* 2012 Feb 28;7(2):e32366.
171. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV e S, Melo PH, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One.* 2016 Feb 5;11(2):e0148142.
172. Lee JJ, Pope JE. A meta-analysis of the risk of venous thromboembolism in inflammatory rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2014 Oct 25;16(5):435.
173. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol.* 2013 Sep 1;191(5):2647-56.
174. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Möröy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):177-81.
175. Biermann MH, Veissi S, Maueröder C, Chaurio R, Berens C, Herrmann M, et al. The role of dead cell clearance in the etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus: dendritic cells as potential targets. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Sep;10(9):1151-64.
176. Midgley A, Beresford MW. Cellular localization of nuclear antigen during neutrophil apoptosis: mechanism for autoantigen exposure? *Lupus.* 2011 May;20(6):641-6.
177. Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology.* 2015 Nov;54(11):2085-94.
178. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol.* 2016 Jun 30;7:256.

179. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönerner U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun 17;15(6):623–5.
180. Zhang S, Shu X, Tian X, Chen F, Lu X, Wang G. Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jun 9;177(1):134–41.
181. Seto N, Torres-Ruiz JJ, Carmona-Rivera C, Pinal-Fernandez I, Pak K, Purmalek MM, et al. Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. *JCI Insight*. 2020 Feb 13;5(3):e134189.
182. Zhang S, Shen H, Shu X, Peng Q, Wang G. Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2017 Jan;27(1):122-129.
183. Knight JS, Meng H, Coit P, Yalavarthi S, Sule G, Gandhi AA, et al. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target. *JCI Insight*. 2017 Sep 21;2(18):e93897.
184. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Nov;67(11):2990-3003.
185. Song W, Ye J, Pan N, Tan C, Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Tied to Rheumatoid Arthritis: Points to Ponder. *Front Immunol*. 2021 Jan 29;11:578129.
186. Nakabo S, Ohmura K, Akizuki S, Murakami K, Nakashima R, Hashimoto M, et al. Activated neutrophil carbamylates albumin via the release of myeloperoxidase and reactive oxygen species regardless of NETosis. *Mod Rheumatol*. 2020 Mar 3;30(2):345–9.
187. Catrina A, Krishnamurthy A, Rethi B. Current view on the pathogenic role of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *RMD Open*. 2021 Mar 26;7(1):e001228.
188. Mendez-Rayó T, Ochoa-Zárate L, Posso-Osorio I, Ortiz E, Naranjo-Escobar J, Tobón GJ. Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2018 Apr;25(2):112–25.

189. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jul;73(7):1414–22.
190. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Moore E, Lingampalli N, Uchtenhagen H, James E, et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci Immunol*. 2017 Apr;2(10):eaag3358.
191. Fan L, He D, Wang Q, Zong M, Zhang H, Yang L, et al. Citrullinated vimentin stimulates proliferation, pro-inflammatory cytokine secretion, and PADI4 and RANKL expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2012 Oct 5;41(5):354–8.
192. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Goel RR, James E, Brooks SR, Rims C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *JCI Insight*. 2020 Jul 9;5(13):e139388.
193. O’Neil LJ, Oliveira CB, Wang X, Navarrete M, Barrera-Vargas A, Merayo-Chalico J, et al. Neutrophil extracellular trap-associated carbamylation and histones trigger osteoclast formation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2023 Feb 3;ard-2022-223568.
194. Mydel P, Wang Z, Brisslert M, Hellvard A, Dahlberg LE, Hazen SL, Bokarewa M. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *J Immunol*. 2010 Jun 15;184(12):6882–90.
195. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 18;108(42):17372–7.
196. Trouw LA, Rispens T, Toes REM. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Jun 9;13(6):331–9.
197. Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Casafont-Solé I, et al. Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis*. 2020 May;79(5):587–94.
198. Spinelli FR, Pecani A, Ciciarello F, Colasanti T, Di Franco M, Miranda F, et al. Association between antibodies to carbamylated proteins and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017 Dec 25;18(1):214.

199. Regueiro C, Ortiz AM, Boveda MD, Castañeda S, Gonzalez-Alvaro I, Gonzalez A. Association of high titers of anti-carbamylated protein antibodies with decreased bone mineral density in early arthritis patients. *PLoS One*. 2018 Aug 17;13(8):e0202583.
200. Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, et al. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study. *PLoS One*. 2018 Feb 2;13(2):e0192365.
201. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016 Aug 1;459:89-93.
202. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021 Oct;61(2):194-211.
203. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010 Jul 16;584(14):3193-7.
204. Thålin C, Daleskog M, Göransson SP, Schatzberg D, Lasselin J, Laska AC, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res*. 2017 Jun 4;65(3):706–12.
205. Oliveira SR, de Arruda JAA, Schneider AH, Carvalho VF, Machado CC, Corrêa JD, et al. Are neutrophil extracellular traps the link for the cross-talk between periodontitis and rheumatoid arthritis physiopathology? *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Dec 24;61(1):174-184.
206. Luque-Tévar M, Perez-Sanchez C, Patiño-Trives AM, Barbarroja N, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, et al. Integrative Clinical, Molecular, and Computational Analysis Identify Novel Biomarkers and Differential Profiles of Anti-TNF Response in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2021 Mar 23;12:631662.
207. Jariwala MP, Laxer RM. NETosis in Rheumatic Diseases. *Curr Rheumatol Rep*. 2021 Jan 28;23(2):9.
208. Fagerhol MK, Johnson E, Tangen JM, Hollan I, Mirlashari MR, Nissen-Meyer LSH, et al. NETs analysed by novel calprotectin-based assays in blood donors and patients with

- multiple myeloma or rheumatoid arthritis: A pilot study. *Scand J Immunol*. 2020 May;91(5):e12870.
209. Wan R, Fan Y, Zhao A, Xing Y, Huang X, Zhou L, et al. Comparison of Efficacy of Acupuncture-Related Therapy in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Immunol*. 2022 Mar 7;13:829409.
210. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Oct;13(10):606-620.
211. de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 13;20(18):4541.
212. Mohanty T, Sjögren J, Kahn F, Abu-Humaidan AHA, Fisker N, Assing K, et al. A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa. *Blood*. 2015 Oct 29;126(18):2128–37.
213. Ruiz-Limón P, Ortega R, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MDC, Perez-Sanchez C, Jimenez-Gomez Y, et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res*. 2017 May;183:87-103.
214. Burmester GR, Bykerk VP, Buch MH, Tanaka Y, Kameda H, Praetgaard A, et al. Sarilumab monotherapy vs sarilumab and methotrexate combination therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2022 May 30;61(6):2596-2602.
215. Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, et al. Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheumatol*. 2003;30(7).
216. Frade-Sosa B, Ponce A, Inciarte-Mundo J, Morlà R, Ruiz-Esquide V, Macías L, et al. Plasma calprotectin as a biomarker of ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis patients receiving IL-6 antagonists or JAK inhibitors. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2022 Jan 17;14:1759720X2211141.
217. 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 Sep;73(9):1746-8.

218. Wu S, Peng W, Liang X, Wang W. Anti-citrullinated protein antibodies are associated with neutrophil extracellular trap formation in rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal.* 2021 Mar;35(3):e23662
219. Rada B. Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol.* 2019;1982:517-528.