



ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR. PAPEL DE LOS MIRNAS Y FACTORES CLÍNICOS EN LA DETECCIÓN DE PACIENTES CON RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR AUMENTADO

Delia Taverner Torrent

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Delia Taverner Torrent

***ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR. Papel de los miRNAs y
factores clínicos en la detección de pacientes con
riesgo de enfermedad cardiovascular aumentado***

TESIS DOCTORAL

Dirigida por los doctores

Lluís Masana Marín
Silvia Paredes González-Albo
Joan Carles Vallvé Torrente

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Reus

2020



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “**ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR. Papel de los miRNAs y factores clínicos en la detección de pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular aumentado**”, que presenta Delia Taverner Torrent para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de biomedicina de esta universidad.

Reus, 14 de abril de 2020

Los directores de la tesis doctoral

Dr. Lluís Masana Marín

A handwritten signature in blue ink, consisting of several vertical strokes followed by a horizontal line and a small flourish.

Dra. Silvia Paredes González-Albo

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'S' and 'P' followed by a horizontal line and a flourish.

Dr. Joan Carles Vallvé Torrente

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'J' and 'V' followed by a horizontal line and a flourish.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a los directores de esta tesis, el trabajo, la dedicación, el tiempo y el esfuerzo constante que han demostrado a lo largo de todo este recorrido. Algo que nunca imaginé que haría, ha sido posible gracias al Dr. Lluís Masana, a la Dra. Silvia Paredes y al Dr. J. Carles Vallvé.

A Rai, Carmen y Núria por compartir las mañanas de los viernes conmigo, mientras duró la recogida de todos los datos.

A los pacientes y a los controles sanos por que sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.

A todas las personas que me han acompañado desde el primer día que decidí ser médico. En especial a esos compañeros que han significado tanto para mí (Betina, Mari, Sandra, Rubén, Mila, Claustre, Eli, Joan y Sonia) por que no solo he aprendido el “arte de curar”, si no a compartir experiencias buenas y malas que me han servido para ser quien soy a día de hoy.

Al Hospital del Mar.

Por su puesto a mi familia que siempre está a mi lado. Mammy, Daddy, Franky, Ana, Lucía y Xabier. Por vuestro cariño y apoyo constante.

A David, por vivir y convivir conmigo. Gracias a ti también por ser mi compañero en el viaje de la vida.

Y como no, a mis hijos, Júlia y Gabriel por todo lo que me están enseñando. Por que todo vale la pena por vosotros.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	14
1.1. ARTRITIS REUMATOIDE: MORBILIDAD Y MORTALIDAD	16
1.1.1 Morbi-mortalidad en pacientes con artritis reumatoide.....	16
1.1.2 Factores pronósticos asociados a la elevada mortalidad descrita en pacientes con artritis reumatoide	18
1.1.3 Comorbilidad y causas de muerte en artritis reumatoide	19
1.1.3.1 Enfermedad cardiovascular	20
1.1.3.2 Neoplasias.....	21
1.1.3.3 Enfermedad pulmonar	21
1.1.3.4 Osteoporosis	21
1.1.3.5 Alteración cognitiva, depresión y ansiedad	22
1.1.3.6 Infecciones.....	22
1.2 INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	23
1.2.1 Proteína C- reactiva	23
1.2.2. TNF- α	24
1.2.3 IL-1 β	24
1.2.4 IL-6	25
1.2.5 Glicoproteínas	26
1.3 ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	26
1.3.1. Factores de riesgo cardiovascular tradicionales y enfermedad cardiovascular en artritis reumatoide.....	27
1.3.2. Fármacos en artritis reumatoide y enfermedad cardiovascular.....	28
1.3.3. Inflamación en artritis reumatoide y enfermedad cardiovascular	29
1.4. ARTRITIS REUMATOIDE Y ARTERIOSCLEROSIS	31
1.4.1. Proceso patogénico de la arteriosclerosis	31
1.4.2. Arteriosclerosis subclínica y artritis reumatoide	34
1.5. microRNA	37
1.5.1. miRNAs y artritis reumatoide	38
1.5.1.1. miRNAs circulantes en sangre periférica y líquido sinovial.....	39
1.5.1.2. miRNAs e inflamación y daño articular.....	40
1.5.1.3. miRNA y proliferación sinovial, activación y apoptosis.....	41
1.5.1.4. miRNAs y tratamientos en artritis reumatoide	42
1.5.1.5. miRNAs y actividad de la enfermedad en artritis reumatoide.....	43
1.5.2 miRNAs y enfermedad cardiovascular	43
1.5.2.1. miRNAs circulantes en sangre periférica	44
1.5.2.2. miRNAs y arteriosclerosis	45
1.5.2.3. miRNAs en rigidez y calcificación arterial	45

1.5.2.4. miRNAs en hipertensión y dislipemia.....	46
1.5.2.5. miRNAs e infarto agudo de miocardio.....	47
1.5.2.6. miRNAs e insuficiencia cardíaca congestiva	48
1.5.2.7. miRNAs y tratamientos en enfermedad cardiovascular	49
1.6 microRNAs EN ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
2.1 HIPÓTESIS.....	55
2.2 OBJETIVOS	55
RESULTADOS.....	57
3.1 Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: sex-specific associations and differential effects of disease activity and age.....	59
3.2 Assesment of arterial stiffness variables in patients with rheumatoid arthritis: a mediation analysis.....	73
3.3 MicroRNA differential expression shared between rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction: an exploratory study.	83
3.4 Plasma circulating mir-425-5p and mir-451a as biomarkers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients: association with subclinical atherosclerosis, arterial stiffness and inflammatory parameters.....	87
RESUMEN DE RESULTADOS.....	117
DISCUSIÓN GENERAL	127
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143
ABREVIATURAS	177

INTRODUCCIÓN

1.1. ARTRITIS REUMATOIDE: MORBILIDAD Y MORTALIDAD

1.1.1 Morbi-mortalidad en pacientes con artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica caracterizada por la afectación inflamatoria crónica y simétrica de la membrana sinovial de las articulaciones. Este proceso autoinmune condiciona destrucción del cartílago y de la unión osteocartilaginosa así como afectación de ligamentos y tendones. No se conoce la causa exacta de la AR y se considera una enfermedad multifactorial, resultando de la interacción de diversos factores de riesgo como la susceptibilidad genética, el sexo, la edad, el hábito tabáquico, la presencia de agentes infecciosos, factores hormonales, dietéticos, socioeconómicos y étnicos [1].

Los diversos estudios publicados sobre la incidencia y prevalencia de la AR en las últimas décadas estiman una prevalencia de entre el 0.5 y el 1% según la población estudiada, con una incidencia anual del 0.02-0.05% [1]. Los datos de las pasadas décadas sugieren que la incidencia (al menos en mujeres) parece estar aumentando después de cuatro décadas de descenso [2]. Tanto incidencia como prevalencia aumentan con la edad hasta alrededor de los 70 años y es una enfermedad que predomina en mujeres en una relación de hasta 4:1 [3,4].

Dado que en la mayoría de los pacientes con AR, el curso de la enfermedad es crónico y progresivo, existe un elevado coste socio-económico así como un importante impacto sobre la función física, la productividad, la calidad y la esperanza de vida de los pacientes [5]. El uso generalizado de los fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES), la incorporación de los agentes biológicos al tratamiento de la AR, la comorbilidad asociada y la incapacidad laboral derivada de la enfermedad son factores condicionantes de un impacto económico significativo para el conjunto de la sociedad [6]. Montesinos et al. publican un estudio observacional, multicéntrico, longitudinal y prospectivo, de un año de duración que intenta proporcionar datos acerca del impacto económico generado por la AR en España y el coste total promedio por paciente y año resulta de 5.901,10 euros [7].

Diversos estudios han demostrado un aumento de la mortalidad en pacientes con AR respecto a la población general. En una revisión sistemática y metaanálisis de 11 estudios longitudinales publicada en 2013, con un total de 51.890 pacientes con AR en

el periodo comprendido entre 1955-1995, se concluye que la mortalidad ha descendido entre los pacientes con AR respecto a las pasadas décadas pero aún permanece más alta que en la población general [8]. La tasa de mortalidad estandarizada (TMS, descrita como la relación entre el número de muertes observadas en sujetos con AR en un periodo de tiempo y el número de muertes observadas en la población general en el mismo periodo) varía entre 1.28 y 2.98 [9] y la supervivencia esperada disminuye entre 3 y 10 años [10]. A pesar de los avances en cuanto al manejo de los pacientes con AR, la mortalidad prematura por las comorbilidades asociadas sigue siendo un reto importante. La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte en AR llegando a ser de hasta el 50% más alta respecto a la población general [11].

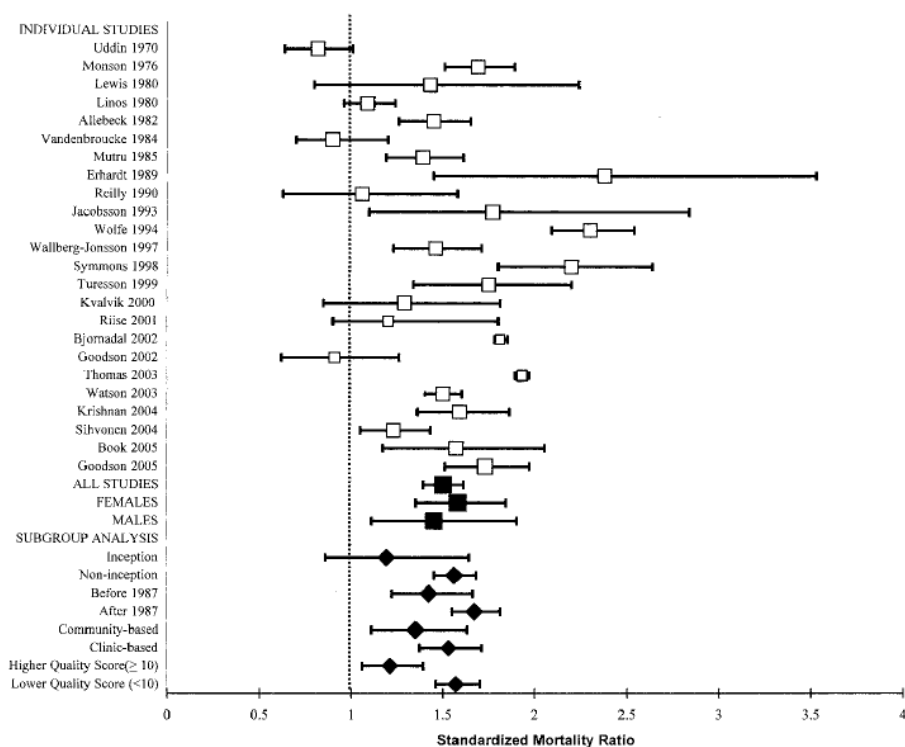


Fig. 1. Metaanálisis de 24 estudios observacionales de pacientes con AR y eventos CV. Se incluyen 111.758 pacientes con AR. El riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria isquémica y por accidente cerebrovascular fue del 59% y 52% respectivamente (meta-TMS 1.59, 95% IC 1.46-1.73 y meta-TMS 1.52, 95% IC 1.40-1.67, respectivamente). Tomado de Aviña-Zubieta et al. *Arthritis Rheum.* 2008 Dec 15;59(12):1690-7 [12].

1.1.2 Factores pronósticos asociados a la elevada mortalidad descrita en pacientes con artritis reumatoide

Se ha descrito que el exceso de mortalidad en pacientes con AR podría deberse al aumento del riesgo cardiovascular (CV) que presentan y teniendo en cuenta que la arteriosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria, se ha propuesto que un estado inflamatorio aumentado en los pacientes con AR explicaría, al menos en parte, el aumento del riesgo CV [13,14].

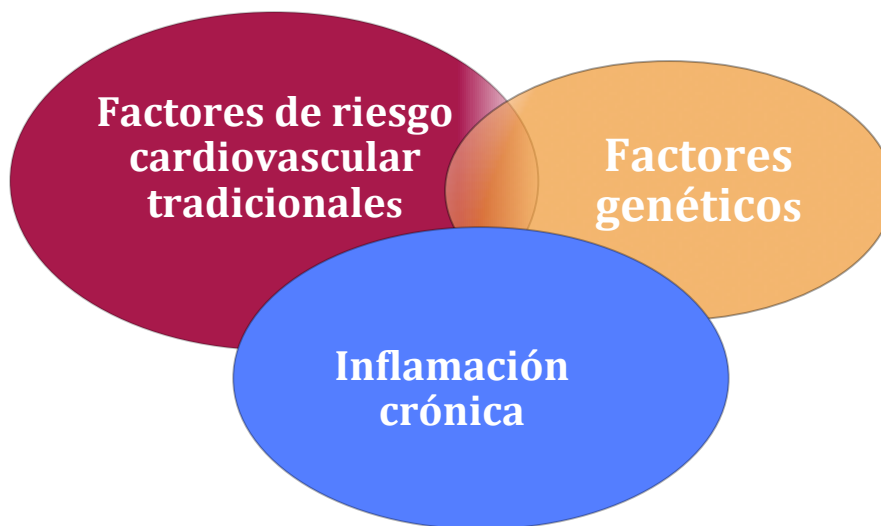


Fig 2. ECV en AR: efecto aditivo. Tomado de Dessein, P.H. et al. J Rheumatol 2005;32,435-42 [15].

Todo esto ha motivado el estudio de los factores pronósticos de mortalidad en AR. En un estudio reciente publicado en población española, se identifican los siguientes factores de riesgo independientes de menor supervivencia en AR: sexo masculino, edad avanzada en el momento del diagnóstico, presencia de factor reumatoide (FR) (la detección de los anticuerpos péptido cíclico citrulinados o ACPA en los primeros años del estudio no estaba disponible), elevado número de ingresos hospitalarios, mayor actividad de la enfermedad y mayor daño radiológico [16]. Además, la predisposición genética de la población caucásica contribuye significativamente al desarrollo de la enfermedad y a su mayor severidad y por tanto, a mayor riesgo de muerte. Otros factores específicos de la AR como el FR, los ACPA, las erosiones óseas y las manifestaciones extraarticulares [17,18] se han relacionado directamente con el desarrollo de arteriosclerosis precoz y por tanto, con un aumento del riesgo CV y de la mortalidad.

1.1.3 Comorbilidad y causas de muerte en artritis reumatoide

Los pacientes con AR tienen un aumento en el riesgo de desarrollar comorbilidades que van a contribuir de forma significativa a su discapacidad y empeoramiento de la calidad de vida. Las comorbilidades pueden preceder o acompañar a la AR y existe suficiente evidencia de que la inflamación sistémica y la disfunción inmune que caracteriza la AR juegan un papel primordial en su desarrollo y aceleración [19]. Además, algunas de estas comorbilidades están aumentadas debido a los fármacos utilizados para tratar la enfermedad, especialmente los corticoides [20] y a la presencia de factores de riesgo CV tradicionales como el tabaquismo [21].

El pronóstico de la AR ha mejorado en los últimos años gracias a los nuevos tratamientos que permiten un control más estricto en cuanto a la actividad de la enfermedad. Sin embargo, las comorbilidades en la AR aun están poco reconocidas a pesar de su impacto en la calidad de vida de los pacientes. Diversos estudios, como el estudio internacional COMORA [22] sobre prevalencia de comorbilidades en AR y su monitorización demuestran que el cumplimiento de las guías que se utilizan para detectar y monitorizar estas comorbilidades es subóptimo incluso en la cohorte española [23]. Este estudio confirma además, que la elevada prevalencia de comorbilidades en pacientes con AR es realmente variable entre los diferentes países que participan en el estudio.

Las comorbilidades que más se asocian con la AR son la ECV, las neoplasias, concretamente el linfoma, la afectación intersticial pulmonar y la pleuritis, la osteoporosis, la discapacidad cognitiva, la depresión, la ansiedad y las infecciones. De todas éstas, la ECV es la principal causa de muerte en pacientes con AR.

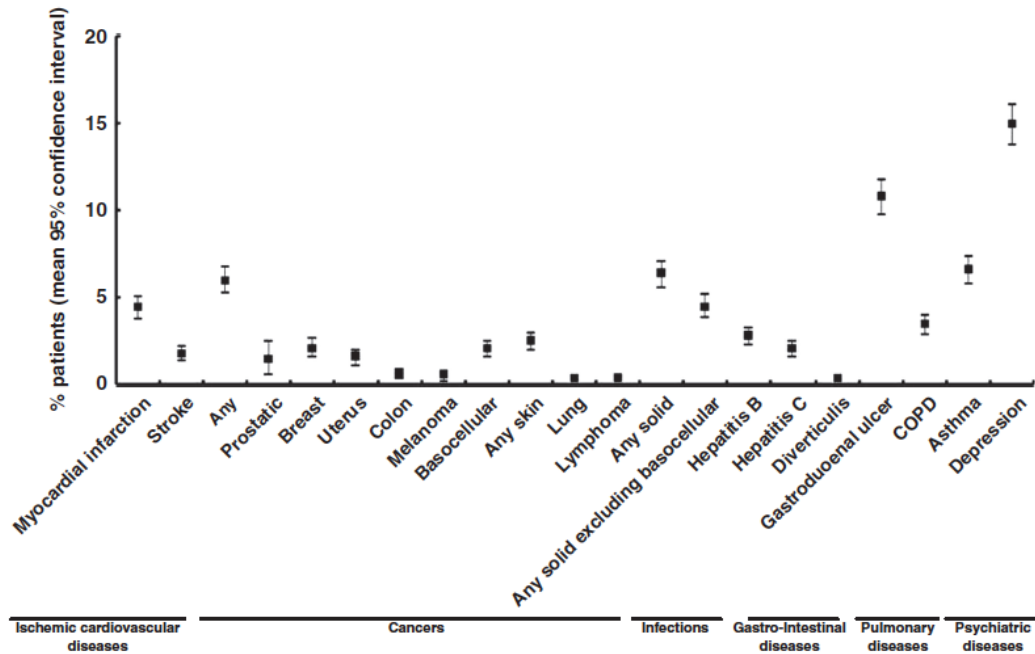


Fig 3. Prevalencia de las comorbilidades evaluadas en 3.920 pacientes con AR (estudio internacional y transversal COMORA). Tomado de Dougados *et al.* [22]. La depresión fue la comorbilidad más frecuente. En el 6% de los pacientes había ECV (IC 95% 5.3% al 6.8%). Esta prevalencia oscilaba entre el 1% en Marruecos y el 17% en Hungría.

1.1.3.1 Enfermedad cardiovascular

La AR en sí puede considerarse como un factor de riesgo independiente para desarrollar una ECV y su prevalencia es tan alta como en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [24]. Un meta-análisis demuestra que la TMS varía entre 0.99 y 3.82 para infarto agudo de miocardio (IAM) y entre 1.08 y 2 para las enfermedades cerebrovasculares (ACV) [25], mientras que el riesgo de desarrollar arteriopatía periférica es de 2.35 en una cohorte de EEUU. En otro meta-análisis de 14 estudios observacionales que incluyen 41.490 pacientes con AR, publicado por Aviña-Zubieta *et al.*, el riesgo de IAM y ACV estaba aumentado en un 70% (RR 1.7 (95%-IC 1.4-2)) y 41% ((RR 1.4 (95%-IC 1.1-1.7)), respectivamente [12]. Los factores de riesgo tradicionales como la dislipemia, la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo y la obesidad son más prevalentes en pacientes con AR respecto a la población general [26] y aunque contribuyen al desarrollo de arteriosclerosis en AR, su presencia por sí sola no puede explicar el aumento del riesgo CV de forma completa [27,28].

1.1.3.2 Neoplasias

En un meta-análisis de 21 estudios, la AR fue un factor de riesgo independiente para el desarrollo de linfoma (de hasta dos veces aproximadamente) [29] especialmente en los pacientes con alta actividad de la enfermedad y presencia de FR [30]. El riesgo de cáncer colorrectal parece estar disminuido [31]. En un estudio retrospectivo de 84.475 pacientes con AR, se observó mayor riesgo de cáncer de pulmón, hígado y esófago siendo menor el riesgo de cáncer de próstata, mama y ovario [32]. Una revisión sistemática de 49 estudios demostró que los pacientes con AR en tratamiento con anti-TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) no tenían un riesgo aumentado de neoplasias en general, ni de linfoma o cáncer de piel no-melanoma en comparación con los pacientes con AR que no utilizaban anti-TNF- α . Si embargo, el riesgo de melanoma podría estar aumentado [33].

1.1.3.3 Enfermedad pulmonar

La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) y la pleuritis son una de las manifestaciones extra-articulares más comunes en la AR [34]. Además, la afectación pulmonar se puede relacionar con algunos de los tratamientos utilizados en la enfermedad o con el hábito tabáquico. La EPI es la manifestación pulmonar más frecuente en AR. Bongartz et al. encontraron en un estudio longitudinal de 582 pacientes con AR y 603 individuos sin AR que el riesgo de desarrollar EPI en pacientes con AR era del 7.7% en comparación al 0.9% en pacientes sin AR [35]. La asociación entre enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la AR está menos establecida. Aunque algunos estudios objetivan un riesgo relativo (RR) mayor de EPOC en estos pacientes, factores de confusión como el tabaquismo podrían justificar esta asociación [36].

1.1.3.4 Osteoporosis

En un estudio que incluye más de 30.000 pacientes con AR, el RR de presentar una fractura de cadera fue de 2 (95%-IC 1.8-2.3) y para fractura vertebral de 2.4 (95%-IC 2-2.8) [37]. Entre los factores que favorecen la disminución en la densidad mineral ósea estarían los corticoides utilizados en el tratamiento de la enfermedad y la mayor prevalencia de caquexia descrita en pacientes con AR [38].

1.1.3.5 Alteración cognitiva, depresión y ansiedad

Los estudios sugieren que el deterioro cognitivo es más frecuente en pacientes con AR en comparación con controles [39] y que se asocia con más limitaciones funcionales, dolor y depresión. Los factores de riesgo que se asocian al deterioro cognitivo son el nivel educacional, la renta o los ingresos, el uso de corticoides vía oral y la presencia de factores de riesgo CV [40]. La depresión y la ansiedad son muy prevalentes en pacientes con AR, llegando a ser de hasta el 16.8% [41] y de entre 13-22% [42] respectivamente y se asocian con una peor evolución de la enfermedad [43].

1.1.3.6 Infecciones

Al igual que en otras patologías inflamatorias, en la AR parece existir un aumento en el riesgo de infecciones bacterianas, fúngicas, oportunistas, víricas y tuberculosas. Además, el riesgo aumenta cuando estamos ante AR más agresivas y severas [44]. El uso de los corticoides y en algunos estudios, la terapia anti-TNF- α , ha demostrado aumento en el riesgo de infección [45]. En estudios observacionales no randomizados, los pacientes con AR severa suelen recibir estas terapias por lo que el efecto de la propia AR se confunde con el efecto de los tratamientos utilizados. Este sesgo podría explicar una proporción del aumento de las infecciones observadas en estos pacientes. En un estudio de 2.108 pacientes con poliartritis inflamatoria, la incidencia de infección fue 2,5 veces mayor respecto a la población general. El tabaquismo, el uso de corticoides y el FR fueron los predictores independientes de hospitalización por infección [46]. La tuberculosis (TBC) parece estar aumentada en pacientes con AR independientemente del tratamiento [47], aunque no se ha descrito esta asociación en otros estudios [48]. Además, los tratamientos anti-TNF- α , sobretudo en el caso de infliximab [49] y los corticoides a dosis medias aumentan el riesgo de TBC [50].

En cuanto a las infecciones virales, parece existir un aumento de herpes zóster en AR [51] y de la hepatitis C y B, aunque existe gran variabilidad dependiendo de los países estudiados [22].

1.2 INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

En enfermedades asociadas con bajo grado de inflamación como la hipertensión, la diabetes y la obesidad, la proteína C-reactiva (PCR) se considera un biomarcador fiable de la función endotelial. El término disfunción endotelial se caracteriza por la pérdida o la disregulación de los mecanismos homeostáticos que operan en las células endoteliales (CE) sanas. Esto facilita el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión, aumento de la síntesis de factores protrombóticos y proinflamatorios, aumento del estrés oxidativo y aumento de la proliferación y del tono de las células musculares lisas (CML) [52]. Existe evidencia de que la disfunción endotelial está presente en la fisiopatología del desarrollo de la arteriosclerosis [53] y un número significativo de citoquinas participan en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Estudios experimentales han demostrado el efecto perjudicial del TNF- α , la interleuquina-1 (IL-1) y la interleuquina-6 (IL-6) sobre la función endotelial, la homeostasis vascular y el riesgo CV [54].

1.2.1 Proteína C- reactiva

La PCR es un marcador de inflamación extensamente utilizado en práctica clínica. Participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa y su expresión está inducida por citoquinas inflamatorias como la IL-6, IL-1 β y el TNF- α . Sus niveles se asocian con múltiples estados proinflamatorios incluyendo la arteriosclerosis. La PCR estimula la producción de citoquinas inflamatorias en los monocitos y reactiva las quimiocinas y moléculas de adhesión en las CE. La asociación entre niveles elevados de PCR y presencia de arteriosclerosis subclínica y ECV se ha documentado previamente en la literatura [55]. Diversos estudios prospectivos han demostrado que elevaciones modestas de los niveles basales de PCR pueden predecir eventos CV futuros. El estudio JUPITER es un estudio randomizado, doble ciego y controlado con placebo, de prevención primaria en el que se compara el tratamiento con rosuvastatina 20mg (indicada en hipercolesterolemia primaria o dislipidemia mixta así como para prevención de ECV) frente a placebo en sujetos sanos, sin ECV, con niveles normales de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pero con valores altos de PCR ultrasensible. En este ensayo se demuestra que, en sujetos aparentemente sanos tanto hombres como

mujeres, que no tienen hiperlipidemias y que presentan niveles elevados de PCR ultrasensible, la rosuvastatina reduce significativamente las tasas de un primer episodio CV y la mortalidad total frente a placebo [56]. En el estudio FOURIER, evolocumab (anticuerpo monoclonal contra PCSK9 que disminuye los niveles de lípidos), disminuye el riesgo de eventos CV independientemente de los niveles basales de PCR aunque se observa la tendencia a experimentar un beneficio absoluto mayor con el fármaco cuando la PCR basal es más alta [57]. En otro estudio con bococizumab (anticuerpo monoclonal contra PCSK9 que disminuye los niveles de lípidos) se observa que los pacientes con niveles de PCR más altos tienen un riesgo CV mayor futuro respecto a los pacientes con PCR bajas, a pesar de la reducción máxima de los niveles de LDL [58]. Se podría concluir por tanto, que la terapia combinada con tratamientos que reducen los niveles de lípidos y la inflamación sistémica, podría reducir el riesgo CV futuro en mayor medida.

1.2.2. TNF- α

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria secretada por macrófagos activados, monocitos, neutrófilos, linfocitos T, granulocitos, células epiteliales y CML. Contribuye a la necrosis celular local y promueve la angiogénesis. Además aumenta la fagocitosis y la citotoxicidad en neutrófilos y modula la expresión de otras muchas proteínas como la IL-1 y la IL-6.

En estudios epidemiológicos, las concentraciones elevadas de TNF- α se han asociado con un riesgo aumentado de ECV y de eventos coronarios recurrentes [59,60].

El papel del TNF- α en la disfunción endotelial y la homeostasis vascular se soporta por los resultados de investigaciones en humanos y animales sobre los efectos de los inhibidores específicos del TNF- α . Por ejemplo, el tratamiento con adalimumab (anticuerpo monoclonal indicado para la artritis reumatoide y espondiloartritis) reduce de forma significativa la adhesión de los leucocitos a las CE y además reduce la expresión de las células de adhesión (V-CAM-1, ICAM-1 y selectina E) [61] que permiten la interacción entre las células entre sí y con la matriz extracelular.

1.2.3 IL-1 β

Un exceso en la producción de IL-1 β induce la adhesión de los leucocitos al endotelio,

aumento de la actividad procoagulante y estimulación del crecimiento y quimiotaxis de las CML, procesos básicos en la patogénesis de la arteriosclerosis [62]. Se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la IL-1 β con anakinra (anticuerpo monoclonal contra la IL-1 α y β aprobado para la artritis reumatoide, enfermedad de Still y síndromes autoinflamatorios asociados a la criopirina) reduce las concentraciones de la endotelina-1 (que actúa como un vasoconstrictor potente endógeno) así como la rigidez arterial obteniendo una mejoría de las medidas clínicas de función endotelial en pacientes con AR [63]. En el estudio reciente CANTOS, aleatorizado controlado con placebo en 10.061 participantes con antecedentes de IAM y concentraciones de PCR \geq 2mg/L, canakinumab, un anticuerpo monoclonal contra la IL-1 β (aprobado para la enfermedad de Still, los síndromes autoinflamatorios asociados a la criopirina y la artropatía gotosa) a dosis de 150mg cada tres meses, reduce de forma significativa la recurrencia de eventos CV en comparación con placebo e independientemente de la disminución de los niveles de lípidos [64].

1.2.4 IL-6

La IL-6 regula la sobreexpresión en las CML del receptor tipo 1 de la angiotensina II, responsable de vasoconstricción, apoptosis celular y efectos proinflamatorios. Además, la IL-6 altera la vasodilatación dependiente del endotelio en modelos animales [65]. Aumentos en la concentración de IL-6 están significativamente asociados con una reducción de la vasodilatación dependiente del endotelio tanto en sujetos sanos como en pacientes con hipertensión e hipercolesterolemia [66]. Se ha demostrado una asociación significativa entre las concentraciones plasmáticas de IL-6 y los marcadores clínicos de rigidez arterial en pacientes con hipertensión [67]. Las concentraciones elevadas de IL-6 en plasma predicen el riesgo de IAM y de enfermedad coronaria con un 25% más de riesgo en eventos vasculares futuros por cada aumento en la concentración de Log IL-6 (RR 1.25, 95% IC 1.19 a 1.32) [68]. Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la IL-6 (indicado para artritis reumatoide y arteritis de células gigantes) produce un aumento en la vasodilatación dependiente del endotelio y así reduce la rigidez arterial en pacientes con AR [69]. En otro estudio, tocilizumab mejora la función endotelial y reduce los marcadores de estrés oxidativo, inflamación y trombosis en pacientes con AR [70].

1.2.5 Glicoproteínas

Diversos estudios han demostrado el papel de las glicoproteínas en la inflamación y en otros procesos biológicos claves como la adhesión celular, el transporte y eliminación molecular, transducción de señales, modulación del sistema inmune y control de la homeostasis celular [71–74]. La glicosilación de proteínas es un proceso postraduccional que involucra la adición enzimática de carbohidratos a la proteína [75]. En este proceso se unen cadenas de glicanos al nitrógeno de un residuo de asparagina (enlace N) o al oxígeno de un residuo de serina o treonina (enlace O) mediante un enlace covalente. Estas cadenas son ricas en N-Acetilglucosamina (GlcNAc), N-Acetilgalactosamina (GalNAc) y ácido N-Acetilneuramínico (o ácido siálico) [74,76–78]. Los niveles plasmáticos de glicoproteínas circulantes aumentan (proteínas de fase aguda positivas) o disminuyen (proteínas de fase aguda negativas) durante la respuesta de fase aguda a la presencia de algunos estímulos ambientales en el organismo [78]. El papel de la glicosilación en los cambios estructurales de las proteínas hace que éstas sean idóneas como potenciales biomarcadores precoces de enfermedad [79].

1.3 ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

En la literatura está bien establecido el aumento de la ECV en pacientes con AR respecto a la población general [18,80–82]. La ECV engloba la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica, la ACV y la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Dicho aumento podría explicarse por la concurrencia de diferentes procesos de forma simultánea. El uso de tratamientos como los antiinflamatorios no esteroides (AINES) y los corticoides [83,84] junto con la presencia de factores de riesgo CV tanto tradicionales [14] como nuevos, tienen un papel fundamental.

La inflamación crónica de la propia AR [85], la presencia de placas carotídeas, los ACPA, el FR, las manifestaciones extraarticulares y la discapacidad funcional son los nuevos factores de riesgo CV a tener en cuenta por la creciente evidencia de su asociación con el aumento de la morbi-mortalidad CV en pacientes con AR [14].

Si tenemos en cuenta la población general, está establecido que el riesgo CV es más elevado en hombres respecto a mujeres y que además aumenta con la edad. Sin embargo, existen estudios en los que no se confirma de forma categórica esta tendencia en los pacientes con AR. En un meta-análisis reciente, Fransen et al. observan que el

RR de presentar una ECV en pacientes con AR es igual para hombres y mujeres aunque sí resulta ser dependiente de la edad. Los pacientes con AR y menos de 50 años tienen un RR de ECV mayor mientras que en los pacientes de más de 65 años, el RR de ECV es menor (todo ello independientemente del género) [86].

1.3.1. Factores de riesgo cardiovascular tradicionales y enfermedad cardiovascular en artritis reumatoide

La presencia de HTA, dislipemia, insulino-resistencia, obesidad, la inactividad física y el tabaquismo son más prevalentes en pacientes con AR respecto a la población general [26]. Así mismo, la probabilidad de desarrollar una AR en pacientes fumadores o ex-fumadores es 1.5 veces más alta que en la población general. Fumar se ha asociado con la positividad para el FR y los ACPA así como con el aumento del daño radiográfico y con un debut de la enfermedad más agresivo [87].

La dislipemia es común en la AR afectando al 55-65% de los pacientes [88].

Está descrito que como consecuencia de la inflamación y de la actividad de la enfermedad existen también cambios cualitativos que hacen que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) pierdan su función antiaterogénica y antioxidante, pasando a tener un perfil prooxidativo y proaterogénico [89]. Paradójicamente, niveles más bajos de lípidos se asocian con aumento del riesgo CV y esto se justificaría por las alteraciones cualitativas del perfil lipídico que se asocian a mayor riesgo CV. Hurt-Camejo et al. observaron que el estado de inflamación crónica en pacientes con AR induce cambios cualitativos en las lipoproteínas plasmáticas, a través de la acción hidrolítica de la fosfolipasa A2 (PLA2), dando lugar a un perfil de lipoproteínas más aterogénico [90]. Además la alteración en la función de las HDL podría disminuir su efecto antioxidante [91,92] y la disfunción de las LDL, el aumento de la ratio apolipoproteína B/apolipoproteína A1 (apo-B/apo-A1) y de los niveles de lipoproteína (a) aceleraría el proceso de arteriosclerosis [93]. Por tanto, la inflamación crónica se correlaciona con un patrón de dislipemia más aterogénico medido mediante el ratio colesterol total (CT) / HDL y el ratio triglicéridos (TGs) / HDL así como con un aumento de los niveles de glucosa en plasma [94]. Teniendo en cuenta la controversia generada entre inflamación y perfil lipídico, se ha recomendado como mejor marcador para la valoración del riesgo CV la medición del ratio CT / HDL, ya que sus niveles disminuyen durante la inflamación [93].

En cuanto a la HTA, los resultados sobre su asociación con AR parecen discordantes. La propia enfermedad puede considerarse como un factor de riesgo para su desarrollo ocasionando disfunción endotelial, inhibición de la función vasodilatadora, calcificación vascular y por tanto aumento de la presión arterial [95]. Su prevalencia en pacientes con AR oscila entre el 57% y el 70.5% y generalmente tanto el diagnóstico como el tratamiento de este factor de riesgo CV no es óptimo [96]. Un meta-análisis que incluye siete estudios de casos y controles no demostró diferencias en la prevalencia de HTA entre pacientes con AR y controles [97]. Contrariamente Panoulas y colaboradores [98] demostraron una mayor prevalencia, al igual que los resultados del estudio internacional COMORA que demostraron una prevalencia del 40% en pacientes con AR [22]. Aunque no se ha demostrado que los FAMES aumenten la tensión arterial, otros tratamientos como los AINES o los corticoides utilizados en la AR sí que tienen efecto a este nivel. Además otras comorbilidades frecuentes en AR como la obesidad, el estrés y la inactividad física pueden contribuir al desarrollo de HTA.

1.3.2. Fármacos en artritis reumatoide y enfermedad cardiovascular

Los fármacos utilizados en AR y teniendo en cuenta que tanto la propia enfermedad como la arteriosclerosis son enfermedades inflamatorias, podrían inhibir también diferentes vías de inflamación responsables de la arteriosclerosis. El mecanismo exacto no se conoce pero se han obtenido efectos beneficiosos en la función de las lipoproteínas y en el metabolismo del colesterol [99]. Un meta-análisis reciente de 28 estudios observacionales sugiere que el riesgo de presentar eventos CV puede disminuir con el uso de los anti-TNF (RR 0.7;95%-IC 0.5-0.9;p=0.005) y con el metotrexato (RR 0.7;95%-IC 0.6-0.9;p=0.007) [100]. No queda tan claro el efecto beneficioso de los AINES y los corticoides. Aunque los AINES se asocian a aumento de HTA y fallo cardíaco, existen diversos estudios en los que no se demuestra dicha asociación [101–103]. Aún así, las recomendaciones actuales sugieren utilizar los AINES con precaución en los pacientes con AR, especialmente en presencia de otros factores de riesgo CV o con una ECV establecida [104]. En cuanto a los corticoides, generalmente también se asocian a un aumento del riesgo CV y algunas publicaciones demuestran que estos efectos adversos son dosis-dependientes [105–107]. Sin embargo, hay otros estudios que demuestran que el efecto antiinflamatorio de los corticoides contrarresta el aumento del riesgo CV y por tanto su uso podría ser beneficioso [27]. En cualquier caso, las

guías de la Liga Europea contra las enfermedades reumáticas (EULAR) recomiendan el uso de corticoides a la mínima dosis y durante el menor tiempo posible [108,109].

La utilización de FAMES o de las terapias dirigidas contra citoquinas, han demostrado un efecto antiinflamatorio y antiarteriosclerótico. Aunque se ha constatado en múltiples publicaciones que el metotrexato reduce la tasa de mortalidad en pacientes con AR hasta en un 70% y en un 21% el riesgo CV total incluyendo el IAM, la ICC y la ACV [100], un estudio reciente realizado en población sin AR y con arteriosclerosis estable, no demuestra reducción de eventos CV respecto a placebo principalmente por no conseguir una reducción en los niveles de IL-1 β , IL-6 o PCR [110]. Estos resultados confirman la creencia de que si reducimos la inflamación en la AR, el riesgo CV también disminuye. Por ello es importante conseguir lo antes posible la remisión o la baja actividad de la enfermedad, no solo para mantener la funcionalidad y prevenir el daño estructural, si no también para reducir el riesgo de ECV en estos pacientes. Además, los tratamientos anti-TNF- α como el etanercept, adalimumab, infliximab y golimumab pueden reducir el riesgo de ECV dado que producen inhibición de la disfunción endotelial y de la progresión de la arteriosclerosis disminuyendo las citoquinas proinflamatorias y las moléculas de adhesión endotelial [111]. Respecto a los tratamientos no anti-TNF- α tales como el tocilizumab, rituximab, abatacept, anakinra y tofacitinib, actúan en otros niveles del sistema inmune por lo que se conoce en menor medida su efecto en cuanto a la morbi-mortalidad CV. Aunque existe un número limitado de estudios clínicos en este sentido [112–114], cada vez se publican más resultados que demuestran que estos tratamientos pueden reducir la ECV.

1.3.3. Inflamación en artritis reumatoide y enfermedad cardiovascular

Que el estado inflamatorio crónico de la AR contribuye al inicio y desarrollo de la arteriosclerosis acelerada podría justificarse dado que el proceso inflamatorio en la sinovial y en las placas arterioscleróticas es muy similar [115]. Además existe aumento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6 que facilita la disfunción endotelial como paso inicial en la arteriosclerosis, ocasionando finalmente formación y ruptura de placas de ateroma [116]. En esta línea, se ha descrito previamente que la inestabilidad de la placa de ateroma condiciona aumento de la inflamación vascular, lo que ocasionaría mayor incidencia de eventos coronarios en la AR [117].

La necesidad de incluir el efecto de la inflamación propia de la AR como factor de riesgo CV a la hora de estratificar a nuestros pacientes ha motivado que la EULAR publique una serie de recomendaciones para el manejo del riesgo CV en artritis inflamatorias incluyendo la AR [108,109,118]. La utilización de las tablas de la guía SCORE de riesgo CV adaptadas para pacientes con AR (SCORE modificado para AR) permiten estimar el riesgo de mortalidad CV a 10 años en función del sexo, la edad, los valores de presión arterial sistólica (PAS), el hábito tabáquico y las cifras de CT. En este sentido es importante identificar además, factores inherentes a esta enfermedad inflamatoria crónica y por este motivo es recomendable multiplicar el riesgo CV estimado según las tablas SCORE por 1,5 puntos cuando se cumplan al menos 2 de los siguientes 3 criterios: AR \geq 10 años, FR o ACPA positivos o presencia de manifestaciones extraarticulares.

Además, EULAR propone una valoración cada 5 años del riesgo CV excepto en pacientes con riesgo intermedio en los que se podría revalorar antes, especialmente si existe una progresión rápida de la enfermedad o en pacientes con riesgo alto o ECV establecida, en los cuales el manejo de todos los factores de riesgo CV debería realizarse siguiendo las guías existentes [108].

Diversos estudios destacan en cambio, que la recomendaciones EULAR, tras utilizar el SCORE modificado (SCOREm), infraestiman el verdadero riesgo CV en estos pacientes [119,120]. En un estudio de Corrales et al. de 327 pacientes y tras aplicar el SCORE, 96 individuos fueron clasificados con un bajo riesgo CV, 201 con moderado y 30 con alto o muy alto [121]. Tras realizar el SCOREm, sólo 5 (2%) de los pacientes fueron reclasificados a riesgo CV alto o muy alto. De ahí la necesidad de buscar nuevos parámetros de detección precoz del riesgo CV, como por ejemplo, la identificación de arteriosclerosis subclínica [122]. Recientemente se ha publicado una revisión en la que se consideran otros marcadores a tener en cuenta para identificar pacientes con AR y elevado riesgo CV [123]. Diversos estudios han revelado la implicación de un componente genético en el desarrollo de la enfermedad CV de pacientes con AR. Además, niveles séricos de algunos biomarcadores relacionados con el síndrome metabólico, adipocinas y biomarcadores de activación de CE e inflamación se han considerado como predictores de ECV en estos pacientes. López-Mejías y colaboradores sugieren que la estratificación del riesgo CV en pacientes con AR debería incluir los siguientes ítems: 1) recogida de datos clínicos y demográficos (incluyendo información sobre la edad, sexo, duración de la enfermedad, niveles de FR, presencia /

ausencia de ACPA, factores tradicionales de riesgo CV y consumo de AINES); 2) valoración por ultrasonidos del grosor íntima-media carotídea (GIMc) así como de la presencia / ausencia de placas carotídeas; 3) obtención de muestra sanguínea para obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) y sérum de cada paciente. El ADN debería ser utilizado para evaluar la genética de los pacientes mediante microarrays. Además se podrían valorar los niveles circulantes de biomarcadores relacionados con MetS (representan un grupo de factores de riesgo CV tales como la obesidad, triglicéridos elevados, niveles bajos de HDL, niveles de PAS y presión arterial diastólica (PAD) elevados e hiperglicemia), adipocinas y biomarcadores de activación de CE. La combinación de estas tres áreas permitiría una mejor estratificación del riesgo CV en AR [123].

1.4. ARTRITIS REUMATOIDE Y ARTERIOSCLEROSIS

1.4.1. Proceso patogénico de la arteriosclerosis

La arteriosclerosis es un proceso progresivo caracterizado por la infiltración y acumulación en la pared vascular de lípidos y componentes del sistema inmunitario, la proliferación de CML y la acumulación de componentes del tejido conectivo. Este proceso provoca un engrosamiento y una pérdida de elasticidad de la pared de los vasos sanguíneos que puede ocasionar lesiones arterioscleróticas. Las lesiones avanzadas pueden ocasionar manifestaciones clínicas como la isquemia por oclusión progresiva de la luz vascular, aunque la complicación clínica más importante es la ruptura de la placa de ateroma y la formación de un trombo que puede ocasionar un IAM o un accidente cerebrovascular.

Al inicio de la aparición de las lesiones arterioscleróticas, la permeabilidad, elasticidad y el grosor de la pared vascular presentan alteraciones motivadas por la disfunción endotelial y la inflamación [124] causada por un incremento del colesterol circulante. Por tanto, los cambios en el mecanismo de control homeostático son las alteraciones iniciales de la disfunción endotelial y del proceso arteriosclerótico.

El incremento de la expresión de las moléculas de adhesión, citoquinas inflamatorias y factores protrombóticos y del estrés oxidativo, conjuntamente con una modulación anormal del tono vascular, provocan la retención local de lipoproteínas (LDL,

lipoproteína (a) y lipoproteínas remanentes) en moléculas adheridas a la matriz extracelular de las CE, particularmente los proteoglicanos dando como resultado un aumento en la penetración de lípidos a la pared arterial [125]. Estas lipoproteínas retenidas sufren modificaciones (agregación, lipólisis y oxidación) que provocan la liberación de fosfolípidos y peróxidos lipídicos que activan la respuesta inflamatoria en las células circulantes [126]. Este hecho, atrae diferentes células circulantes, en particular, los monocitos 1) entran al subendotelio, 2) se diferencian en macrófagos, 3) activan la expresión de receptores *scavenger* y *toll-like* para captar las lipoproteínas retenidas y modificadas, 4) se transforman en células espumosas y 5) éstas quedan retenidas en la lesión. Además, las células T, los mastocitos y otras células inflamatorias se incorporan a la lesión arteriosclerótica y junto con los macrófagos, contribuyen a esta respuesta inflamatoria alterada. En las lesiones ya establecidas, se produce un efecto feedback que amplifica el aumento de retención de lipoproteínas ya que los receptores *scavenger* no están controlados por feedback negativo como el receptor de la LDL y esto provoca que el macrófago tenga una capacidad ilimitada de acumular colesterol. Las CML migran a la íntima y promueven la formación de un tapón de colágeno y fibrinógeno. A medida que la lesión progresa, los macrófagos mueren, lo cual origina áreas necróticas llenas de restos extracelulares, cristales de colesterol, proteasas y material procoagulante y protrombótico. También, los receptores *toll-like* inician una cascada de señales dentro de los macrófagos que facilita la liberación del óxido nítrico y enzimas proteolíticas que degradan la matriz y causan que la placa se desestabilice. En este punto del proceso, las placas pueden erosionarse o fisurarse dando lugar a la trombosis y al accidente vascular. En estadios iniciales, el proceso es reversible si se disminuyen las concentraciones de lipoproteínas que contienen apoB circulantes en plasma. En estadios más avanzados, los procesos de retención de las lipoproteínas son más complejos y difíciles de revertir [127].

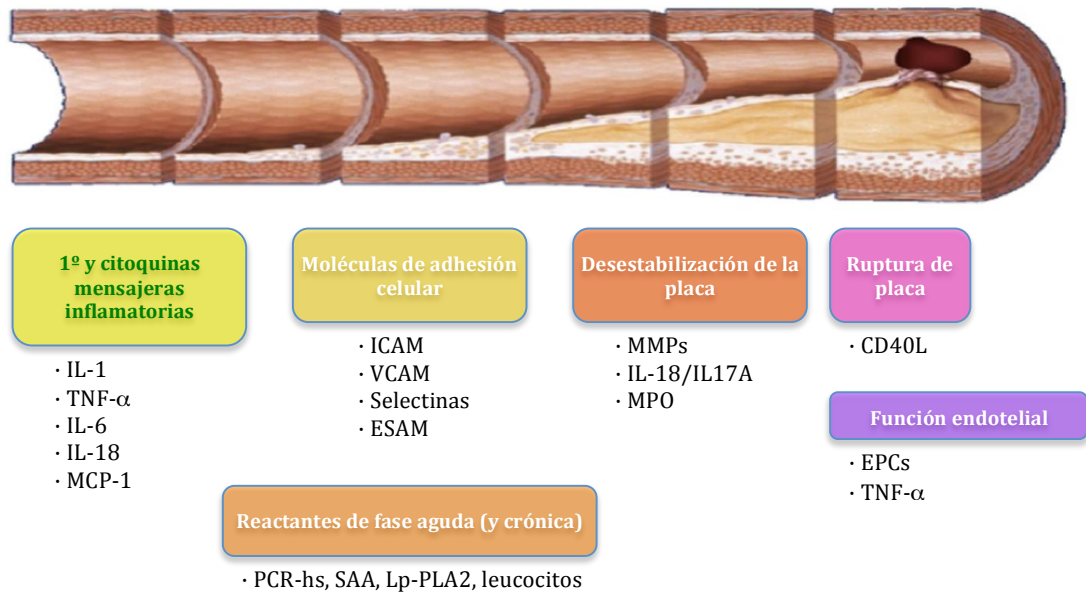


Fig. 4. Estadios de la arteriosclerosis. Importancia de la inflamación. PreStay et. al. Circulation. 1995;92:1355-1374.

Recientemente se ha determinado también que los microRNA (pequeños nucleótidos no codificantes capaces de regular, aproximadamente, el 30% de todos los genes productores de proteínas), pueden inducir represión de la traducción del ácido ribonucleico (RNA) y actuar como reguladores de la inflamación, la angiogénesis y la apoptosis y por lo tanto, modificar la vulnerabilidad de la placa [128].

Así pues, se ha intentado explicar la relación de la sinovitis con la arteriosclerosis de una forma esquemática de la siguiente manera: desde el tejido sinovial (localización primaria de la lesión de la AR), diversas citoquinas se estimulan y pueden liberarse en la circulación sistémica, con lo que pueden alterar a distancia la función de diferentes tejidos, incluyendo el tejido adiposo, el músculo esquelético, el hígado y el endotelio vascular, y generar un espectro de cambios proaterogénicos que incluyen la resistencia a la insulina, dislipemia, efectos prooxidativos así como disfunción y daño endotelial [129].

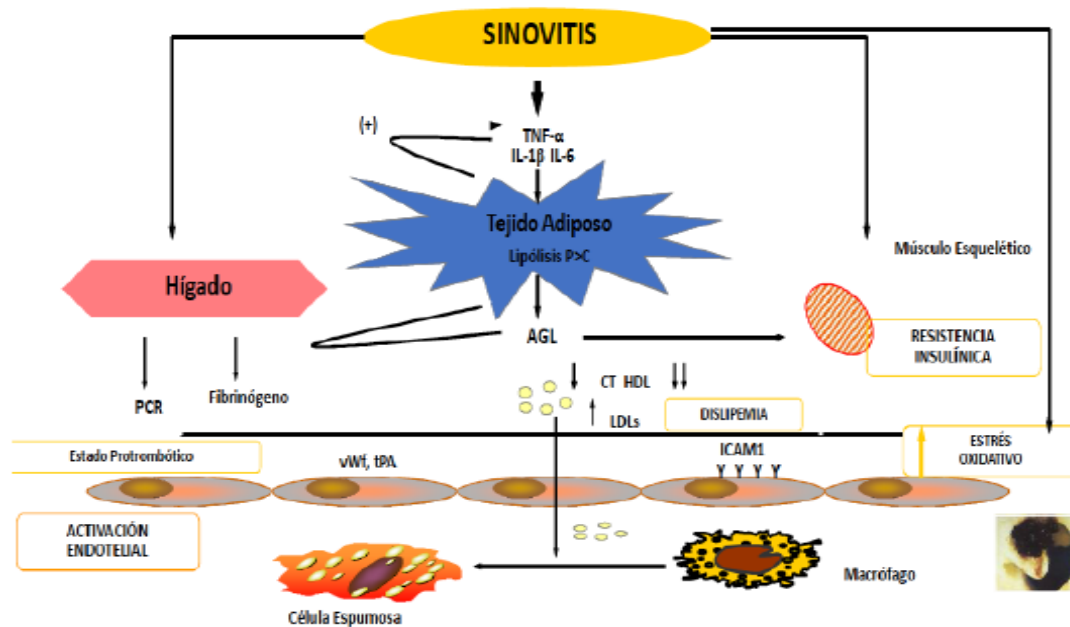


Fig.5. Inflamación crónica en enfermedad inflamatoria crónica: Arteriosclerosis acelerada. Sattar et al. *Circulation*. 2003; 108:2957-2963 [129].

1.4.2. Arteriosclerosis subclínica y artritis reumatoide

La arteriosclerosis carotídea puede determinarse mediante la valoración por ultrasonidos del GIMc. Esta determinación se basa en establecer la distancia entre la interfase luz-endotelio vascular y media-adventicia y es un método fiable, reproducible y no invasivo [130,131]. Un GIMc aumentado refleja una condición preaterogénica y existe evidencia de que el número acumulado de factores de riesgo CV tradicionales contribuye al mayor riesgo CV en AR [26]. Así mismo, las directrices epidemiológicas que tratan el riesgo CV en población general, recomiendan tanto la valoración del GIMc como la presencia de placas en arteria carotídea (definida entre un rango de GIMc > 1.2-1.9 mm, o un grosor focal mayor del 50% del área que lo rodea) [132].

Se ha valorado en múltiples estudios, la relación existente entre GIMc y presencia de placa carotídea con AR. Aunque los últimos resultados abogan por el aumento del GIMc y de la prevalencia de placas en pacientes con AR respecto a controles [133–138], se han publicado otros artículos en los que no se demuestra esta asociación [139,140]. En un meta-análisis de 22 estudios en 2011, se comparan los datos del GIMc de 1.384 pacientes con AR con 1.147 controles. Diecisiete de los 22 estudios encuentran un GIMc aumentado en AR respecto a controles, con diferencias estadísticamente significativas. La media del GIMc en AR resultó de 0.71 mm y de 0.62 mm en controles

sanos sin otros factores de riesgo CV [141,142]. Además, el aumento del GIMc y la presencia de placas carotídeas predicen el riesgo de morbilidad CV en AR. Concretamente un GIMc >0.9 mm tiene un elevado poder predictivo para el desarrollo de eventos CV a los 5 años de seguimiento [135,143] y también se ha demostrado que la presencia de placa carotídea o de un GIMc >0.9 mm está presente en el 60% de los pacientes con un riesgo CV moderado [121]. Ambrosino et al. publicaron resultados de 59 estudios sobre GIMc en AR comparado con controles. No todos los estudios incluyeron información de la actividad de la enfermedad, pero la media del índice de actividad DAS28 (disease activity score o índice de actividad de la enfermedad) oscilaba entre 2.6 y 6.2. De los 59 estudios, 51 reportaron un GIMc aumentado en pacientes con AR respecto a controles. El mismo metaanálisis demostró que el género masculino y un estado inflamatorio mayor (medido por DAS28, PCR y velocidad de sedimentación globular (VSG)) se asociaba con un aumento del GIMc [133]. F. van Breukelen et al., sin embargo encontraron que en una población de 243 pacientes con AR el GIMc fue similar al del grupo control sin AR [139], contrariamente a otros estudios en los que el GIMc en AR estaba aumentado ya desde el inicio de la enfermedad [144–147]. La diferencia de resultados podría deberse a la baja actividad de los pacientes incluidos.

A la hora de evaluar la relación del GIMc y prevalencia de placa carotídea, con la duración de la enfermedad, detectamos resultados nuevamente dispares [148,149]. Diversos estudios reportan una asociación positiva entre GIMc y duración de la enfermedad [150–153] aunque existe evidencia de que un GIMc aumentado y una mayor prevalencia de placas carotídeas se ha observado tanto en pacientes con AR precoz como tardía en comparación con pacientes controles. Además, la diferencia de medias del GIMc entre AR y controles resultaba mayor cuando se consideraba el grupo de pacientes con AR precoz (0.21mm) en comparación con pacientes afectados de AR tardía (0.09mm). Estos resultados se podrían explicar probablemente por la menor edad de los pacientes incluidos en los estudios de AR precoz. En este contexto clínico, el efecto proaterogénico de la AR parece ser más significativo y esto apoya la hipótesis de que el riesgo CV ya se inicia junto con los primeros signos de inflamación, desde algunos meses o incluso años antes del diagnóstico [154]. Arts et al. encuentran que el riesgo CV en AR no resultó aumentado después de 10 años de duración en comparación con los primeros 10 años de la enfermedad [155]. Ambrosino et al, en los modelos de regresión tampoco observan correlación significativa e incluso, el impacto de la AR en

el GIMc fue particularmente significativo en pacientes con AR precoz (<12 meses) [133].

La presencia de placas en carótidas se considera un predictor de riesgo CV más fiable que el GIMc. En el metaanálisis de Ambrosino et al. se revisan 35 estudios en los que existe un aumento de la prevalencia de placas carotídeas en 2.859 AR en comparación con 2.303 controles, con una odds ratio (OR) de 3.61 (32,7% vs 11,4%) [133]. Otro estudio de Corrales et al. demuestra que en pacientes con un SCOREm moderado se observan anomalías severas a nivel de carótidas (GIMc >0.9 mm y/o placa) en el 63% de los casos [121].

Otro parámetro que ayuda a valorar la enfermedad arteriosclerótica es la rigidez arterial medida mediante la velocidad de la onda de pulso (PWV del inglés pulse wave velocity), el índice de aumento (AIx del inglés augmentation index (AIx) y la distensibilidad [156]. Se ha observado que en enfermedades inflamatorias como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y la AR existen aumentos significativos en la PWV y estos aumentos correlacionan con GIMc más elevados [157–161]. Además, Provan et al. [159] demostraron en un estudio de 15 años de duración el valor predictivo de la PCR con el aumento de la rigidez arterial, confirmando el papel de la inflamación en los cambios arterioscleróticos precoces. Recientemente sin embargo, se ha publicado un estudio en el que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AR de corta duración y controles en cuanto a la PWV y el AIx. Además tampoco se obtuvo correlación entre marcadores inflamatorios y parámetros de rigidez arterial en los pacientes con AR [162].

Diversos factores de riesgo específicos de la AR tales como la actividad de la enfermedad, los marcadores de inflamación y los ACPA se han asociado con un aumento del GIMc y del riesgo CV. Numerosas publicaciones encuentran asociación entre GIMc y VSG [133,142,144,147,163] o PCR [133,147,163–167], con el DAS28 [153,163,164] así como con la positividad para el FR [142] y los ACPA [166,168–170]. Barbarroja et al. demostraron que los ACPA actúan como inductores directos del estado prooxidativo y del perfil inflamatorio y aterogénico de los linfocitos, monocitos y neutrófilos en la AR [169]. Vázquez et al. demostraron asociación entre los niveles de ACPA y los de la PCR con un GIMc elevado y mayor riesgo CV [166]. Por otro lado y al igual que sucede con todos los parámetros revisados hasta el momento, en la cohorte de van Breukelen et al., el FR y los ACPA no se asociaron con el GIMc en el modelo

multivariable y estos resultados están en la misma línea que otros estudios en los que no se demuestra esta asociación [24,150,171–175].

Así mismo ha quedado reflejado que la carga inflamatoria se asocia con cambios tanto cuantitativos como cualitativos en las lipoproteínas [90]. La relación del perfil lipídico con la arteriosclerosis subclínica en AR es igualmente confusa. Se ha descrito asociación entre CT, TGs y LDL oxidadas con GIMc y presencia de placa [163,176,177] así como con los niveles bajos de HDL y GIMc [178], pero los estudios son escasos y no permiten definir conclusiones.

1.5. microRNA

Los microRNAs (miRNAs o miRs) constituyen una familia de RNAs pequeños, de entre 18-24 nucleótidos, que regulan la expresión genética. Actúan a nivel postranscripcional alterando la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), bien tras reprimir su transcripción o bien, promoviendo su degradación [179–181]. El proceso de biogénesis de los miRNAs está regulado en diferentes puntos. El transcrito primario es un precursor denominado pri-miRNA que puede codificar uno o más miRNAs y que está transcrito desde intrones y/o exones o desde regiones intergénicas. Los pri-miRNAs se pliegan en estructuras con uniones imperfectas y son procesados por la enzima Drosha obteniendo moléculas de 60 a 100 nucleótidos conocidas como pre-miRNA. Los pre-miRNAs se transportan al citoplasma mediante la exportina 5, dónde son procesados mediante la endonucleasa DICER para formar estructuras dobles de miRNAs con uniones imperfectas. De los dos miRNAs, la cadena “guía” se selecciona para formar el miRNA maduro mientras que la cadena “pasajera” es a menudo degradada. El miRNA maduro se incorpora al complejo RISC encargado de reconocer el RNAm diana e inducir el silenciamiento postranscripcional. El grado de complementariedad entre las parejas miRNA:ARNm formadas determina, en muchos casos el nivel de silenciamiento [182].

Los miRNAs se han implicado en la morfogénesis de los tejidos, en diversos procesos celulares como la apoptosis, proliferación o la diferenciación celular así como en la respuesta inmune innata y en la adaptativa, controlando la diferenciación de varios tipos celulares y sus funciones inmunológicas [183]. Durante la activación de la inmunidad innata, se ha observado un aumento de miRNAs específicos que tienen la habilidad de influenciar la respuesta a agentes infecciosos virales y/o microbianos. La capacidad

además, para modular la respuesta adaptativa y la diferenciación de células B y T, sugiere que los miRNAs participan en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes [182].

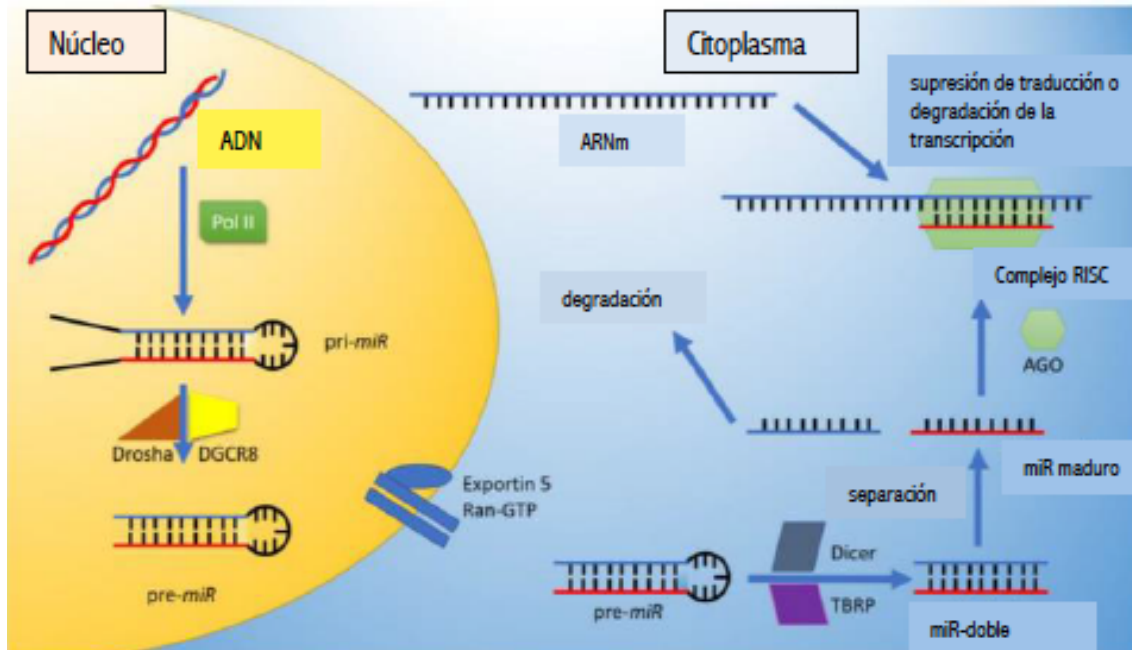


Fig 6. Síntesis de miRNAs. MicroRNA perspective on cardiovascular development and disease: an update. Islas JF. Int J Mol Sci. 2018 Jul 17;19(7) [184].

1.5.1. miRNAs y artritis reumatoide

El rol de los factores genéticos y epigenéticos en el desarrollo de las enfermedades reumáticas se ha considerado, en las últimas décadas como un campo de investigación interesante. Investigar el papel de los miRNAs en la AR es un tema de actualidad y se intenta valorar el uso de éstos como biomarcadores en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Estudios recientes sugieren que las alteraciones en la expresión de los miRNAs pueden contribuir a los mecanismos moleculares de la AR. Muchos de estos estudios han examinado en pacientes con AR, la alteración en la regulación de los miRNAs en plasma, células y tejidos, incluyendo fibroblastos sinoviales (FS), células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos T CD4+ [185,186].

1.5.1.1. miRNAs circulantes en sangre periférica y líquido sinovial

Además de regular dianas intracelulares, se sabe que los miRNAs están presentes en plasma a concentraciones fisiológicamente significativas y que sus niveles son estables (28 h - 5 días) [187]. Esta estabilidad en plasma, además de las funciones biológicas conocidas que tienen dentro de las células, les otorgan gran relevancia en los mecanismos patológicos de las enfermedades. Además facilita que sean candidatos ideales para los tests diagnósticos y como biomarcadores de enfermedad y dianas terapéuticas. Pauley et al. [188] observaron, en pacientes con AR, un aumento de entre 1,8 y 2,6 de miR-16, miR-132, miR-146a y miR-155, en CMSP respecto de controles sanos. Adicionalmente, el aumento de miR-16 y miR-146a se correlacionó con la actividad de la enfermedad. Se ha descrito también la sobreexpresión de miR-223 en linfocitos T (LT) CD4+ de pacientes con AR respecto a controles sanos. Teniendo en cuenta que en dicho grupo de pacientes no se expresa miR-223, se podría considerar la probable asociación con enfermedad [189]. Estos estudios sugieren la posibilidad de medir la expresión de miRNA en las CM y LT de sangre periférica de pacientes con AR, lo que facilitaría el estudio, ya que es más sencillo de obtener que el tejido sinovial. Murata et al. [190] midieron la concentración de miR-16, miR-132, miR-146a y miR-223 en líquido sinovial de pacientes con AR y osteoartritis (OA) y en plasma en pacientes con AR, OA y en controles sanos. Se objetivó una sobreexpresión en el plasma, respecto al líquido sinovial, tanto en pacientes con AR como con OA de miR-16, miR-132, miR-146a y miR-223. Para estimar el origen de los miRNAs tanto del plasma como del líquido sinovial, se cultivaron FS, tejido sinovial y CMSP y de tejido sinovial y posteriormente, se midieron sus concentraciones. Se encontró que la expresión de miRNAs en el líquido sinovial fue distinta que la del plasma y que ésta podría reflejar el estado del espacio articular. Las concentraciones de miR-16, miR-146a, miR-155 y miR-223 en el líquido sinovial de pacientes con AR fueron más altas que en pacientes con OA (con diferencias estadísticamente significativas) por lo que el líquido sinovial podría ser utilizado como herramienta diagnóstica de AR y OA. La concentración plasmática de miR-132 en pacientes con AR y OA, así como la de miR-16 en pacientes con OA, fue más baja que en pacientes sanos y esta diferencia fue estadísticamente significativa. Por ello el estudio concluye que los miRNAs plasmáticos de pacientes con AR y OA son similares pero diferentes ($p < 0.05$) de los sujetos sanos. A la hora de correlacionar los resultados con algunas variables clínicas se objetivó que

miR-16, miR-146a, miR-155 y miR-223 en plasma, pero no en líquido sinovial se correlacionaron de forma inversa con el número de articulaciones dolorosas (NAD) y miR-16 también con DAS28. Por ello se hipotetizó que la expresión relativa de los miRNAs en el líquido sinovial comparada con la del plasma sería mejor indicador de la condición articular en AR que la concentración absoluta en líquido sinovial. Posteriormente el mismo grupo de Murata et al. identifican niveles de miR-24, miR-30a-5p y miR-125a-5p como factores cruciales para diseñar un modelo de detección de AR. Utilizando estos tres miRNAs, desarrollan una fórmula de “probabilidad estimada de AR mediante miRNA plasmáticos (ePRAM)”, la cual facilitaría un diagnóstico más preciso de AR aunque los pacientes tengan ACPA negativos [191]. Otro estudio exhaustivo de los miRNAs en sangre ha reportado un perfil con sobreexpresión de miR-103a-3p, miR-155, miR-146a-5p, miR-26b-3p e infraexpresión de los niveles de miR-346 en pacientes con AR y en sus parientes asintomáticos de primer grado y con ACPA+, cuando comparan con controles sanos [192]. En particular, miR-103a estaba elevado de forma consistente en los parientes asintomáticos de primer grado y con ACPA+ en un periodo de un año. Además miR-22, miR-382 y miR-486-3p estaban sobreexpresados en individuos ACPA+ con enfermedad de inicio, sugiriendo que estos miRNAs específicos podrían ser indicativos de progresión desde “pacientes de riesgo” a “inicio de enfermedad” [193]. Así pues, cambios en el perfil de miRNAs previos al inicio de la enfermedad clínica podrían dar información para definir una ventana terapéutica que nos permitiría iniciar una estrategia de tratamiento temprano para retrasar el inicio de la enfermedad en estos pacientes de alto riesgo. Más recientemente se ha demostrado que miR-let-7a también se puede correlacionar con AR más severas [194] y en estudios experimentales con ratas se han postulado nuevos posibles biomarcadores de actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento como miR-22, miR-27a, miR-96, miR-142, miR-223, miR-296, miR-298 y miR-451 [195]. El papel del miR-708-5p es más desconocido aunque ya existe una publicación en la que se concluye que este miRNA participa en la patogénesis de la AR inhibiendo la vía Wnt3a/ β -catenina [196].

1.5.1.2. miRNAs e inflamación y daño articular

No solo ha quedado constancia de que existe sobreexpresión de diversos miRNAs tanto en plasma como en tejido sinovial de pacientes con AR, si no que se ha demostrado que algunos de ellos producen citoquinas proinflamatorias. MiR-125b condiciona un aumento en la producción del IL-6, IL-1 β y el TNF- α y del p-65 fosforilado lo que promueve inflamación mediante la activación vía NF-kB [197]. Sin embargo, se ha demostrado infraexpresión de otros miRNAs a nivel de los FS de pacientes con AR en comparación con pacientes con OA. Así, miR-10a-5p y miR-10a están involucrados en la regulación de la inflamación articular de la AR [198]. Existe además infraexpresión de miR-27a en sérum, tejido sinovial y FS [199] y de miR-22 en tejidos sinoviales de pacientes con AR. Esto condiciona un aumento en la expresión de Cyr61 inducida por IL-17, un gen diana de miR-22 y una proteína secretada de matriz extracelular que puede estimular a los FS para que produzcan IL-6 y así promover la diferenciación celular de las células Th17 y la hiperplasia sinovial. También se ha demostrado recientemente que la infraexpresión de miR-22 es consecuencia de mutaciones en p53 que son observadas frecuentemente en AR [200]. En la revisión de Tavasolian et al. se concluye que una sobreexpresión de miR-181a, la agrupación miR-17-92, miR-155 y miR-203 exacerba la inflamación mientras que una sobreproducción de miR-146a y miR-573 suprime la autoinmunidad [185].

1.5.1.3. miRNA y proliferación sinovial, activación y apoptosis

La comparación de los miRNAs de pacientes con AR con los de pacientes con OA ha demostrado que miR-124a está infraexpresado de forma significativa en los FS de pacientes con AR [201] y que su inducción puede interrumpir el ciclo celular ocasionando inhibición y proliferación sinovial [202]. Además, en estudios in vitro la desmetilación del gen del miR-124a mediante el tratamiento con 5-Aza-2'-deoxycytidine puede limitar la proliferación de los FS mediada por la IL-1 β y la expresión del TNF- α [203]. Recientemente, se ha descrito que otros miRNAs tienen la capacidad de inhibir la proliferación o inducir la apoptosis de los FS. MiR-192 está infraexpresado en los tejidos sinoviales de pacientes con AR y, restaurando su expresión se suprime la proliferación celular y se induce la apoptosis de los FS actuando sobre caveolin 1 [204]. De forma similar, la expresión de miR-29a está disminuida en los FS y en el plasma de los pacientes con AR. La inducción in vitro de la expresión de miR-29

en FS inhibe de forma marcada la proliferación, induce la apoptosis y reduce la expresión de citoquinas inflamatorias actuando sobre el ARNm del transductor de señal y activador de la transcripción 3 [205]. Se ha descrito además que miR-15a puede inducir apoptosis celular inhibiendo la expresión de su gen diana Bcl-2 e incluso se ha intentado administrar una inyección intraarticular de miR-15a de doble cadena en modelos murinos con artritis mediada por autoanticuerpos, obteniendo un efecto positivo a nivel de inducción de apoptosis celular en la sinovial [206].

1.5.1.4. miRNAs y tratamientos en artritis reumatoide

Los tratamientos utilizados para controlar la AR pueden influenciar la expresión de los miRNAs [207]. Así pues, se han demostrado diferencias en la expresión de miR-146a, miR-155 y miR-16 entre pacientes con AR de inicio sin tratamiento respecto a pacientes con la enfermedad establecida [208]. Estos hallazgos podrían sugerir que tanto el grado de enfermedad como los fármacos utilizados podrían tener impacto en los niveles de miRNAs [209]. Además, en estudios in vitro de cultivos celulares se ha demostrado que los glucocorticoides pueden inhibir la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacáridos en macrófagos obteniendo una reducción en miR-155 [210]. Se han diseñado estudios en pacientes con AR de inicio, sin tratamiento y se han identificado diversos miRNAs candidatos. Los pacientes con AR de inicio demostraron niveles más bajos de miR-125b en plasma y en CMSP, en comparación con controles sanos y estos aumentaban de forma significativa e inversa con el DAS28 tras la combinación de corticoides y FAMES durante 6 meses [211]. Además los niveles basales de miR-125b en las CMSP también predecían la respuesta al tratamiento a los 3 meses del inicio en estos pacientes. En otra cohorte de pacientes con AR de inicio se demostró que los cambios en los niveles plasmáticos de miR-16 y miR-223 se asociaban a un descenso en el DAS28 tras un periodo de 12 meses de tratamiento con glucocorticoides y FAMES [208]. En un estudio prospectivo, doble ciego, randomizado y controlado con placebo, unos niveles plasmáticos elevados de miR-27a-3p previamente al inicio del tratamiento se asociaron de forma significativa con la remisión de la enfermedad a los 12 meses del inicio de adalimumab más metotrexato [212]. En el grupo de Balzano et. al se demuestra que la expresión de miR-425-5p, miR-21 y miR-212 es menor en pacientes con AR respecto a controles, de forma significativa. Además demuestran relación entre el tratamiento con corticoides y la expresión de miRNAs [213].

Todos estos estudios independientes nos sugieren que los niveles circulantes de miRNAs previos al inicio de los fármacos podrían tener un valor predictivo para monitorizar la respuesta al tratamiento. Pero además de todo esto, los miRNAs podrían considerarse como nuevas herramientas de tratamiento. Así, se podría manipular algunos miRNAs específicos con la intención de inhibir la sobreexpresión de los miRNAs endógenos o como terapia que sustituya la pérdida de funcionalidad de las células y tejidos afectados.

1.5.1.5. miRNAs y actividad de la enfermedad en artritis reumatoide

Tras revisar de forma exhaustiva la literatura, ha quedado constancia de que los miRNAs tienen un gran potencial como biomarcadores en pacientes con AR y que nos aportaran en un futuro, mayor seguridad para el diagnóstico de la enfermedad.

Sin embargo, no queda tan establecido el papel que tienen a la hora de monitorizar la actividad de estos enfermos. De los múltiples miRNAs estudiados en la AR, son pocos los que han demostrado una relación significativa con la inflamación y la actividad de la enfermedad medida ya sea mediante el DAS28 o por la VSG y /o PCR. MiR-146a es uno de los más estudiados y se ha publicado en diversos estudios que además de estar sobreexpresado en sangre periférica de pacientes con AR, se correlaciona de forma positiva con la VSG. En cuanto al DAS28 aunque existe tendencia a una correlación positiva, los resultados no son estadísticamente significativos [214]. Otros miRNAs, como miR-16 [215] y miR-233 se han relacionado con el DAS28 y este último, en pacientes con AR de inicio, también con la PCR [208]. También se ha demostrado que miR-451 se expresa en las células T de pacientes con AR y que se asocia con mayor DAS28, VSG e IL-6 [216].

1.5.2 miRNAs y enfermedad cardiovascular

Se ha descrito en la literatura que los miRNAs están presentes en la pared vascular y que su expresión está alterada en los vasos sanguíneos afectados [217,218]. Los miRNAs juegan un papel importante en la angiogénesis y en la enfermedad vascular tras regular la diferenciación celular, migración, proliferación y la apoptosis de las CML y de las CE vasculares [219].

Teniendo en cuenta que la angiogénesis es un mecanismo importante para el mantenimiento del suministro adecuado de sangre a los tejidos, tanto en el estado normal, como en procesos de enfermedad, se han identificado dos grupos de miRNAs, los pro-angiogénicos y los anti-angiogénicos. En el primer conjunto destacan: miR-126 [220], la agrupación miR-17-92 [221], miR-Let-7 [222], miR-130a, miR-210, miR-378 y miR-296. En los miRNAs anti-angiogénicos se incluyen miR-221/222, miR-328, miR-92a y miR-214 [223].

1.5.2.1. miRNAs circulantes en sangre periférica

Diversos autores han demostrado que las lipoproteínas HDL transportan miRNAs funcionales en la circulación [224–227] y que los complejos HDL-miRNAs presentan alteraciones significativas en la hipercolesterolemia, la ECV y el IAM [225]. Además, las HDL transfieren los miRNAs a las células receptoras en donde regulan la expresión del gen diana [228]. Los numerosos estudios publicados hasta el momento han asociado miRNAs específicos con determinadas condiciones tales como la arteriosclerosis, el IAM y la enfermedad coronaria [181,219,229–232]. El reto de estos estudios es identificar de forma precisa y reproducible miRNAs específicos o un conjunto de ellos que puedan utilizarse como biomarcadores de riesgo o de progresión de enfermedad y que permitan identificar a aquellos pacientes susceptibles de desarrollar la enfermedad. Se ha descrito en la literatura que en pacientes con ECV, la expresión de miR-135a está aumentada, mientras que la de miR-147 está disminuida en CMSP lo que facilitaría un estado pro-inflamatorio. Además los niveles de miR-134, miR-370 y miR-198 están sobreexpresados en pacientes con angina inestable tras facilitar la isquemia sistémica [233,234]. En otro estudio sobre pacientes con ECV se demuestra una reducción significativa de miR-126, miR-17, miR-92a y miR-155 mientras que se observa una sobreexpresión de miR-21, miR-126-3p y miR-222 tras aplicar una ecocardiografía de estrés con dobutamina lo que sugiere que los miRNAs circulantes podrían distinguir pacientes con ECV en función de la presencia de una estenosis significativa [235]. En cuanto a miR-155 su efecto se podría explicar al tener un papel en la disfunción endotelial, la diferenciación de macrófagos y la absorción de lípidos en las LDL oxidadas, lo cual estaría relacionado con la inestabilidad de las placas carotídeas [236].

1.5.2.2. miRNAs y arteriosclerosis

El rol de los miRNAs en las CML vasculares también ha sido identificado recientemente. En el proceso de arteriosclerosis no solo influye el depósito de grasa circulante, si no que otros factores como la disfunción de las CE y la inflamación y diferenciación de las CML vasculares también participan. MiR-21 y miR-221/222 son factores reguladores de la proliferación y la apoptosis de las CML vasculares y se ha descrito su participación en la formación neointimal después de una lesión vascular [223]. Además, se ha descrito que los niveles de miR-21, miR-130a, miR-27b, miR-210 y let-7f están elevados en la capa íntima de placas arterioscleróticas en humanos, así como miR-130a, miR-27b y miR-210 también en el plasma de dichos pacientes. Por otra parte, miR-92a, miR-221, miR-34a y miR-146a/b están sobreexpresados en las partes arterioscleróticas de los vasos y en cambio, miR-10a está infraexpresado y contribuye a la iniciación del estado endotelial proinflamatorio en regiones susceptibles de presentar arteriosclerosis [237]. Se ha demostrado que algunos de estos miRNAs pueden promover la activación endotelial y la formación de placas y concretamente, miR-125a se correlaciona inversamente y de forma significativa con los niveles plasmáticos de LDL de pacientes sintomáticos [236]. También Ji et al. [217] demuestran la participación de los miRNAs en el desarrollo de la íntima vascular y Cordes et al. [238] describen la disminución de miR-145 y miR-143 en arterias de ratones en las que existe proliferación de la íntima tras una lesión. Así mismo, Codagnone et al. observan que miR-126 afecta de forma directa la integridad vascular y que miR-126-5p es el principal responsable en la reparación de las CE inhibiendo NOTCH1 y Dlk1 [239]. Además otra isoforma, miR-126-3p, es responsable de reducir la inflamación mediante la estimulación del VCAM-1 [240].

1.5.2.3. miRNAs en rigidez y calcificación arterial

Los miRNAs juegan un papel significativo en la rigidez y calcificación arterial mediante la modulación de vías y moléculas críticas tales como el TGF- β y la señal de la proteína morfogénica ósea, la angiotensina II, metaloproteinasas de la matriz, el factor de transcripción Runx y el “interruptor fenotípico” de las CML vasculares. Muchos de estos miRNAs pueden tener el mismo gen diana mientras que un único miRNA puede ejercer múltiples funciones afectando a más de un gen y a diferentes vías con resultados

opuestos. Así pues se ha descrito que miR-181b, miR-599, miR-145 y miR-29 disminuyen la rigidez arterial mediante la afectación de las proteínas de la matriz extracelular. En cambio, miR-126 y miR-223 la disminuyen mediante la afectación de las vías citoesqueléticas, metaloproteinasas, óxido nítrico y moléculas de adhesión. Además miR-19b, miR-181a y miR-155 disminuyen la rigidez arterial a través de la antiotensina II. En cambio, miR-203, miR-765, miR-155 y miR-1185 aumentan la rigidez mediante la afectación de las vías citoesqueléticas, metaloproteinasas, óxido nítrico y moléculas de adhesión y miR-21 y miR-130a vía angiotensina II. Múltiples miRNAs también han demostrado su efecto sobre la rigidez arterial tras afectar al “interruptor fenotípico” de las CML vasculares. Entre ellos están miR-143/145, miR-133, miR-1, miR-24, miR-26a, miR-541, miR-96, miR-221/222, miR-223, miR-195, miR-10a, miR-21, miR-146a, miR-18a-5p, miR-23b, miR-663, miR-25, miR-142-5p, miR-365, miR-638, miR-141, miR-490-3p, miR-155, miR-135b-5p, miR-499a-3p, let-7d y miR-15b/16.

En cuanto a los miRNAs que contribuyen a la calcificación arterial, se ha descrito que disminuyen la calcificación miR-29b-3p (a través de las metaloproteinasas), miR-29a/b, miR-30b-c, miR-133a, miR-204, miR-205 y miR-297a mediante el depósito de calcio y la diferenciación de los osteoblastos y miR-125b y miR-135a a través de la transdiferenciación osteogénica de las CML. Por el contrario, miR-32, miR-2861 y miR-3960 aumentan la calcificación arterial vía el depósito de calcio y la diferenciación de los osteoblastos y miR-221/222 a través de la transdiferenciación osteogénica de las CML [241].

1.5.2.4. miRNAs en hipertensión y dislipemia

Los miRNAs participan en la regulación de los niveles de lípidos [242] y de la tensión arterial tan importantes en el mecanismo patogénico de la arteriosclerosis. MiR-33a y miR-33b regulan el metabolismo lipídico a través de ABCA1, ABCG1 y SREBP. Así pues, el control de ambos podría considerarse como una herramienta útil en cuanto a terapia hipolipemiente en la arteriosclerosis [243,244]. Algunos estudios observan que miR-510 está elevado en el plasma de pacientes con HTA [245] y miR-7-5p y miR-26b-5p en pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda en comparación con individuos sanos [246]. Además los niveles de let-7 en las CE y en plasma de pacientes

hipertensos son más altos que en controles sanos y si valoramos que puede inducir estrés oxidativo y daño celular, se sugiere que esta sobreexpresión de let-7 podría agravar la arteriosclerosis [247]. Los niveles de miR-9 y miR-126 en CMSP de pacientes hipertensos están reducidos respecto a pacientes sanos [248]. Si consideramos que miR-9 puede inhibir la expresión de la “miocardina”, utilizar tratamientos con este miRNA podrían mejorar la funcionalidad y estructura cardíaca [249]. MiR-145 y miR-143 parecen tener un papel importante en la HTA, principalmente vía enzima convertidor de angiotensina [229]. Además, la inhibición de miR-145 podría mejorar la resistencia a la insulina vía óxido nítrico [250]. También se ha demostrado en estudios en ratones que miR-21 reduce la presión arterial con una correlación inversa con miR-130a y miR-195, los cuales están sobreexpresados en plasma [251].

1.5.2.5. miRNAs e infarto agudo de miocardio

Teniendo en cuenta que los miRNAs se expresan en sangre [187], Guo-Kun Wang et al. [252] hipotetizan que los miRNAs específicos del tejido cardíaco podrían liberarse al torrente sanguíneo durante un IAM y por tanto podrían ser utilizados para detectar y monitorizar la lesión miocárdica. De los miRNAs estudiados se observa que miR-208a podría detectar individuos con IAM con una sensibilidad y una especificidad del 90,9% y del 100% respectivamente, mientras que miR-499, miR-1 y miR-133a serían menos sensibles. Así mismo, Stephan Fichtlscherer et al. [253] observan que miR-126, miR-17, miR-155 y miR-92a están reducidos significativamente en sangre de pacientes con enfermedad coronaria en comparación con pacientes sanos. Sun et al. observan que miR-1, miR-16, miR-21, miR-92a, miR-195, miR-208, miR-375, miR-494, miR-103, miR-107, miR-325 y miR-874 están sobreexpresados en tejido cardíaco durante y antes del IAM mientras que al mismo tiempo, los niveles tisulares de miR-133a/b, miR-214, miR-873, miR-2861, miR-30b, miR-188-3p y miR-145 están disminuidos. Sin embargo, también se ha demostrado el efecto protector del daño cardíaco mediante la expresión de miR-873 y miR-2861 [254]. En otro estudio de Parizadeh et al. [255] los niveles de miR-122, miR-140-3p, miR-720, miR-2861 y miR-3149 están elevados en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) y los niveles de miR-1, miR-134, miR-186, miR-208, miR-233 y miR-499 son muy sensibles y específicos para el diagnóstico de IAM. Así mismo, miR-186, miR-132 y miR-150 serían los miRNAs más críticos para el

diagnóstico de angina inestable. Otro miRNA que ha demostrado tener un papel importante en la angiogénesis es miR-24 ya que participa en la vascularización cardíaca [256]. Está altamente sobreexpresado en CE cardíacas sobretodo después de una isquemia cardíaca. En estudios con ratones, el bloqueo de miR-24 limita el tamaño del infarto tras prevenir la apoptosis endotelial y mejorar la vascularización. Li et al. [257] valoran los niveles de miR-26a, miR-191 y miR-208b en pacientes con IAM respecto a controles sanos y concluyen que miR-208b está incrementado de forma significativa en estos pacientes respecto a los controles, mientras que los niveles de miR-26a y miR-191 están disminuidos. Se ha descrito recientemente que miR-223 está implicado en diferentes procesos patogénicos a nivel cardíaco incluyendo la hipertrofia de los cardiomiocitos y la necrosis. Van Rooij et al. demuestran que la expresión de miR-233 está aumentada en los márgenes de tejido miocárdico infartado en humanos con ICC tras IAM [258]. Además Xiaoxiao Liu et al. demuestran en cultivos de fibroblastos cardíacos, que la sobreexpresión de miR-233 promueve la proliferación, migración y diferenciación celular mientras que su inhibición tiene los efectos contrarios [259].

1.5.2.6. miRNAs e insuficiencia cardíaca congestiva

La ICC se considera la fase terminal de la mayoría de las ECV. En el estudio de Yan et al. se describen miRNAs circulantes como marcadores potenciales que se podrían comparar con el marcador estándar, el péptido natriurético auricular tipo B (BNP). De este modo, miR-423-5p tendría su relevancia clínica [260]. También se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-212 y miR-132 ocasiona en término final una hipertrofia cardíaca severa con fallo cardíaco secundario [261]. Cai et al. publican que miR-765 está sobreexpresado en el fallo cardíaco por su efecto en la regulación de la contractilidad cardíaca [262]. Del mismo modo, miR-25 está sobreexpresado en estos pacientes [263] y miR-24 regula la homeostasis del calcio produciendo una alteración en la contractilidad de los cardiomiocitos [264]. Melman et al. aportan evidencia de que la expresión cardíaca aumentada de miR-30d tiene un impacto significativo en la respuesta a la terapia de resincronización cardíaca y que los niveles en plasma de dicho miRNA podrían correlacionarse con la respuesta de la técnica en los pacientes con ICC [265]. También se ha demostrado el papel de la infraexpresión de miR-126 en el fallo del ventrículo derecho asociado a hipertensión pulmonar [266] y aunque se han

propuesto otros marcadores de ICC (miR-208a, miR-499, miR-16, miR-27a, miR-101 y miR-150) [267], de momento no quedan bien establecidos.

1.5.2.7. miRNAs y tratamientos en enfermedad cardiovascular

Múltiples estudios han demostrado la implicación de los miRNAs en la patogénesis de varias enfermedades cardiovasculares y destacan además la intervención farmacológica potencial que se puede realizar sobre ellos. En general, se considera que la inhibición de los miRNAs endógenos es menos arriesgada que provocar la sobreexpresión de éstos [268]. En este sentido y como ejemplo, al utilizar el antagonista de miR-29 que regula la fibrosis en el corazón se podría obtener una protección de los cardiomiocitos después del daño ocasionado por la fibrosis [187]. En estudios sobre IAM se valora que los antagonistas de miR-92a y miR-320 reducen el tamaño del infarto tras contribuir a la recuperación de los vasos sanguíneos y a la reducción de las señales apoptóticas [230]. También se ha reportado que miR-1 tiene la capacidad de convertir células madre en cardiomiocitos demostrando la mejoría en la función cardíaca y en la reducción del tamaño del infarto [269]. Otros estudios experimentales en arteriosclerosis utilizan antagonistas de miR-33 obteniendo elevación en las HDL y reducción en las VLDL [270] y un antagonista de miR-145 ha sido estudiado en roedores para promover la reducción del tamaño de la placa y mejorar la vasculatura [271]. Sin embargo, hay limitaciones dado que el uso de miRNAs que no son específicos de un tipo celular o de un órgano, puede ocasionar graves efectos adversos. Claramente la terapia con miRNAs está en un estado preliminar y se requieren estudios no solo en animales si no en fase clínica.

1.6 microRNAs EN ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Hasta el momento se ha demostrado en múltiples estudios que determinados miRNAs están asociados a AR y a ECV de forma independiente. Ha quedado patente de igual manera que la ECV es la principal causa de muerte prematura en AR llegando a ser de hasta el 50% más alta respecto a la población general [11]. Dado que muchos de los miRNAs con un rol en la patogénesis de la AR [272] se solapan con los implicados en el desarrollo de arteriosclerosis [270,273], se podría identificar un patrón de miRNAs

expresados en pacientes con AR que seleccionen a los pacientes en riesgo de padecer ECV.

En la literatura no existen prácticamente publicaciones en las que se contemple este tipo de asociación. En el estudio de Ormseth et al. [274] se valora la asociación entre miRNAs plasmáticos y actividad de la AR (medida mediante el índice DAS28-VSG) y calcificación vascular coronaria. En el estudio se incluyen 168 pacientes con AR y 91 controles y tras valorar siete miRNAs plasmáticos candidatos (por relevancia biológica, por diagnóstico de AR y por su uso como marcadores de actividad de la enfermedad y de arteriosclerosis subclínica en AR), se miden las concentraciones plasmáticas de miR-15a-5p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-125a-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p y miR-223-3p por PCR cuantitativa. Los pacientes con AR tuvieron concentraciones plasmáticas más elevadas de todos los miRNAs respecto a los controles siendo la combinación de miR-24-3p, miR-26a-5p y miR-125a-5p la más significativa para el diagnóstico de AR. Entre los pacientes con AR con FR negativo, miR-24-3p fue el marcador diagnóstico más potente. En cuanto a la actividad de la enfermedad, sólo miR-155-5p se asoció débilmente y de forma inversa con la actividad de la enfermedad (concretamente con el número de articulaciones tumefactas (NAT)). A la hora de evaluar si estos miRNAs se asociaban a factores de riesgo CV en estos pacientes, ninguno demostró asociación con el score de calcificación vascular coronaria. Solo miR-125a-5p se asoció débilmente a la PAD y miR-26a-5p al score de riesgo de Framingham. Otro estudio de López-Pedrerá et al. [275] apunta la importancia de la sobreexpresión de miR-146a tanto en AR como en SCA [276], por lo que se podría hipotetizar que miR-146a podría estar directamente involucrado en la patogénesis de la ECV en pacientes con AR.

Por todo ello y si tenemos en cuenta la elevada mortalidad ocasionada por la ECV en nuestros pacientes con AR, es asumible que indagar en el estudio de estos biomarcadores plasmáticos nos va a facilitar, en un futuro, la prevención de eventos CV catastróficos lo cual es primordial para avanzar en el control estricto de la AR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Existen evidencias importantes en la literatura que muestran que diferentes miRNAs juegan un papel central en la fisiopatología tanto de la AR como de la ECV. Sin embargo, no hay datos que describan miRNAs asociados significativamente con el riesgo CV en pacientes con AR. Así, nuestra hipótesis es que “existe un perfil plasmático de microRNAs en pacientes con AR asociado a un aumento de alteraciones vasculares preclínicas (arteriosclerosis subclínica y rigidez arterial) que podría utilizarse como biomarcador epigenético para valorar el riesgo CV aumentado que presentan estos pacientes”.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo general del estudio es identificar un perfil de expresión de microRNAs en pacientes con AR que identifique a los pacientes en riesgo de desarrollar ECV.

Los objetivos operacionales son:

1. Caracterizar las alteraciones vasculares preclínicas (arteriosclerosis subclínica y rigidez arterial) en nuestra población de pacientes con AR.
 - 1- Estudiar las variables epidemiológicas y de actividad de la enfermedad de la AR asociadas al GIMc y a la presencia de placa arteriosclerótica como variables de arteriosclerosis subclínica.
(Artículo 1)
 - 2- Estudiar las variables epidemiológicas y de actividad de la enfermedad de la AR asociadas a la PWV y a la distensibilidad arterial como variables de valoración de rigidez arterial.
(Artículo 2)
2. Descubrir un perfil plasmático de microRNAs común en pacientes con AR sin ECV preclínica y en pacientes con cardiopatía isquémica sin AR y diferente al de controles sanos que identifique a los pacientes con AR en riesgo de desarrollar ECV.
(Artículo 3: Estudio de descubrimiento)

3. Validar en una cohorte de pacientes con AR los microRNA plasmáticos identificados.

(Artículo 4: Estudio de validación)

- 1- Determinar la asociación de los microRNAs identificados con la presencia de arteriosclerosis subclínica (GIMc y presencia de placa carotídea)
- 2- Determinar la asociación de los microRNAs identificados con la presencia de rigidez arterial (PWV y distensibilidad)
- 3- Estudiar los determinantes clínicos de la expresión de los microRNAs identificados

RESULTADOS

OBJETIVO 1. Caracterizar las alteraciones vasculares preclínicas (arteriosclerosis subclínica y rigidez arterial) en nuestra población de pacientes con AR.

3.1 VARIABLES ASSOCIATED WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN A COHORT OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS: SEX-SPECIFIC ASSOCIATIONS AND DIFFERENTIAL EFFECTS OF DISEASE ACTIVITY AND AGE.

Plos One 2018;13(3):e0193690

RESEARCH ARTICLE

Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age

Delia Taverner¹*, Joan-Carles Vallvé²*, Raimón Ferré³, Silvia Paredes¹, Lluís Masana³, Antoni Castro³

1 Secció de Reumatologia, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain, **2** Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain, **3** Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* jc.vallve@urv.cat



OPEN ACCESS

Citation: Taverner D, Vallvé J-C, Ferré R, Paredes S, Masana L, Castro A (2018) Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age. *PLoS ONE* 13(3): e0193690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690>

Editor: Masataka Kuwana, Keio University, JAPAN

Received: November 24, 2017

Accepted: February 19, 2018

Published: March 1, 2018

Copyright: © 2018 Taverner et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI 10/02547, PI030786), Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBERDEM), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and Sociedad Española de Reumatología. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Objective

To advance the study of variables associated with subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis (RA) with special consideration for the degree of disease activity, age and gender.

Methods

The carotid intima-media thickness (cIMT) and the presence of carotid atherosclerotic plaques along with clinical and biochemical characteristics were determined in 214 RA patients.

Results

Adjusted analysis reveals that men had a 0.059 mm significantly increased cIMT compared with women ($p = 0.001$; $R^2 = 3.8\%$) and that age was associated with cIMT ($\beta = 0.0048$ mm; $p = 0.0001$; $R^2 = 16\%$). Interestingly, we observed a significant interaction between gender and age. Thus, the effect of age on cIMT was significantly increased (12%) in men compared with women (p -value for interaction term = 0.041). Moreover, adjusted multivariable linear regression analysis revealed that disease activity score (DAS28) was significantly associated with cIMT in women ($\beta = 0.021$; $p = 0.018$; $R^2 = 0.03$) but not men. In particular, women with high disease activity had a 0.079 mm increased cIMT compared with women in remission ($p = 0.026$). In addition, men in remission had a 0.134 mm increased cIMT compared with women in remission ($p = 0.003$; $R^2 = 8.7\%$). Active patients did not exhibit differences in cIMT values. Furthermore, 43% of patients presented carotid plaques. The

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

variables independently associated with carotid plaques were age, smoking, health assessment questionnaire, erythrocyte sedimentation rate and rheumatoid factor ($p < 0.0001$; $R^2 = 46\%$).

Conclusion

In our cohort of patients with RA, DAS28 and age are differentially associated with cIMT in men and women. Our findings could explain the contradictory results that have previously been published in the literature.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease that mainly affects synovial joints and causes chronic pain, bone erosion and progressive disability. With a prevalence of up to 0.5–1% of the general population, RA is the most common chronic inflammatory disease [1,2]. In addition to joint involvement, a high prevalence of comorbidities and an increase in cardiovascular (CV) risk characterizes RA patients compared with the general population [1,3]. Epidemiological studies describe a relative risk of developing a CV episode of 1.5 compared with non-RA controls [2]. RA can be considered an independent risk factor for developing CV disease (CVD), with its prevalence being as high as in patients with type 2 diabetes mellitus [4] and leading to an increase in the standardized mortality rate of up to 3.82 for acute myocardial infarction in the United States [5]. The chronic inflammatory state of RA seems to contribute to the development of accelerated atherosclerosis because the inflammatory process in the synovial membrane and atherosclerotic plaques share similar characteristics [6].

The assessment of RA patients with subclinical atherosclerosis by means of ultrasonographic determination of the carotid intima-media thickness (cIMT) and the presence of carotid plaques has been accepted as a good predictor of CV events [7]. However, the relationship between subclinical arteriosclerosis and RA is complex. Increased cIMT reflects a pre-atherogenic condition [8,9]; however, numerous CV risk factors that have causal relationships with atherosclerosis do not seem to fully explain the accelerated atherosclerosis these patients exhibit. Different studies have evaluated the relationship between subclinical arteriosclerosis (cIMT and presence of carotid plaques) and RA. Although recent studies have argued for the increase in cIMT and the prevalence of plaques in RA patients compared with controls [10–15], other articles have been published in which this association is not demonstrated [16–19]. The discrepancy between these results is likely explained by the low activity of the included patients because the degree of disease activity is associated with cIMT [11], which has been postulated to be a limiting factor in the study of the relationship between subclinical arteriosclerosis and RA. In addition, age, which is clearly associated with an increase in cIMT in different populations [20,21], has a more complex relationship in RA. For example, the group of patients with early RA, in which younger patients prevail, presents the greatest difference in cIMT compared with that of controls [10]. Thus, in RA, complex associations are noted between the degree of disease activity, age and cIMT. In addition, to date, no records are available in the literature evaluating the relationships between these associations and the gender of RA patients. Thus, the objective of the present study was to advance the study of the associations between subclinical arteriosclerosis and RA by specifically considering the relationship among age, gender and degree of disease activity of RA patients.

Materials and methods

Patients

The study population included all consecutive patients who visited via external consultations of the University Hospital Sant Joan de Reus and who fulfilled the diagnostic criteria of RA proposed by the American College of Rheumatology of 1987. We excluded patients older than 80 years and younger than 20 years and those with acute intercurrent diseases. Consistent with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration, subjects were informed of the research nature of the study and provided written consent prior to participation. The study was approved by the clinical research Ethics Committee of the University Hospital Sant Joan. Patients were visited between the period of September 2011 and November 2014, and we performed blood collection and carotid ultrasound on the same day of the medical visit.

Laboratory measurements

Blood samples were collected from 214 patients who had fasted for at least 12 hours. Analytical determinations included the following: haemogram, general biochemistry, haemoglobin glycoside, thyrotropin, albumin, lipid profile [triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) and very-low-density cholesterol (VLDLc)] by enzymatic methods; apolipoproteins A1 and B by immunonephelometry; lipoprotein (a) by an enzyme-linked immunosorbent assay; and rheumatoid factor (RF), citrullinated anti-cyclic peptide antibodies (ACPA), antinuclear antibodies and inflammatory markers [erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP) and fibrinogen] by conventional methods. RF positive (RF+) was defined for values of RF > 20, and positive ACPA (ACPA+) was defined for ACPA values > 1.

Clinical evaluation

The presence of CV risk factors (smoking, hypertension, diabetes and hypercholesterolemia) and histories of previous CV events and the use of lipid lowering drugs, antidiabetic agents or antiplatelet drugs were collected. In addition to joint physical examinations of RA, measurements of body weight, height, body mass index (BMI), waist circumference (WC), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were obtained.

As a measure of disease activity, the disease activity score (DAS28) was calculated according to the ESR. Pain was measured using the 0–10 visual analogue scale, and any disability was reported by the patient using the health assessment questionnaire (HAQ) index. The DAS28 variable was categorized as remission ($DAS28 < 2.6$), low activity ($2.6 \leq DAS28 < 3.2$), moderate activity ($3.2 \leq DAS28 \leq 5$) and high activity ($DAS28 > 5$).

Carotid intima-media thickness

To measure cIMT, we used a My Lab 50 X-Vision sonograph (Esaote SpA, Barcelona, Spain) with a linear array ultrasound probe small parts broadband transducer (5–12 MHz). We identified and digitally recorded the far wall of the common carotid artery (1 cm proximal to the bifurcation) and the internal carotid artery (1 cm distal to the bifurcation) of the left and right carotid arteries. cIMT measurements were performed at the predefined points using ThickSoft image processing software (%). To reduce observer variability, a single operator obtained and measured the images. We averaged the measurements of three static images of left and right carotid arteries to obtain the mean cIMT. Carotid artery plaque was defined according to Mannheim consensus [22] as a focal structure that encroaches into the arterial lumen of at

least 0.5 mm or 50% of the surrounding cIMT value or demonstrates a thickness >1.5 mm as measured from the media-adventitia interface to the intima-lumen interface.

Statistical analysis

All data were analysed using the statistical software SPSS, version 23. Continuous variables are presented as the mean (standard deviation) and categorical as the percentage (number of individuals). ANOVA was used to evaluate differences between groups followed by Bonferroni correction as a post hoc test. For categorical variables, the differences between the proportions were analysed using the chi-Squared test. Bivariate correlations were estimated using the Pearson correlation coefficient r . To estimate the cIMT variable, multiple linear regression was used with multivariate models. Multivariate logistic regression was used to estimate the presence of carotid plaques. We initially selected clinical relevant variables and known confounders for inclusion in the multivariable logistic regression analysis. The iterative process of variable selection was performed using stepwise logistic regression analysis. A p -value <0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 214 RA patients were included in the study. [Table 1](#) presents the general characteristics of patients overall and based on gender. Men had significantly increased WC, SBP and DBP and reduced HDLc levels compared with females. Sixty percent of the patients were hypertensive, which was more frequently observed in men (73%) compared with women (52%), and women had significantly increased HAQ, ESR, and DAS28 index values than males ([Table 1](#)). Furthermore, the percentages of women in remission or with low, moderate or high disease activity were different from those for men ([Table 1](#)). A total of 75% of the patients received disease-modifying antirheumatic drugs, which included 20%, 57% and 51% of patients receiving biological drugs, non-steroidal anti-inflammatory drugs and/or corticosteroids, respectively, with no differences between sexes.

Crude analysis of the ultrasonographic variables showed, as expected, that age was highly correlated with cIMT ($r = 0.53$; $p = 0.0001$) and that men presented significantly larger values of cIMT than women (0.678 mm vs 0.627 mm; $p = 0.005$) ([Table 2](#)). After adjusting for traditional confounders and treatments (see [Table 2](#)), we quantified these associations and showed that men had a 0.059 mm larger cIMT than women ($p = 0.001$) and that the gender variable explained a significant 3.8% of the cIMT variability. Moreover, we showed a significant 0.0048 mm increase in cIMT for every year of increase in age ([Table 2](#)) and that the age variable explained a significant 16% of the cIMT variability ([Table 2](#)). Interestingly, we observed a significant interaction between age and gender (p value for interaction term = 0.041); the correlation between age and cIMT was 12% significantly steeper in men than in women ([Fig 1](#)). In particular, cIMT increased 0.0065 and 0.0043 mm for each year increase of age in men and women, respectively. Because of this interaction, further analyses were stratified by gender.

Adjusted multivariable linear regression analyses revealed that DAS28 was significantly associated with cIMT in women ($\beta = 0.021$; $p = 0.018$) ([Table 3](#)) and that DAS28 significantly explained 3% of cIMT variability. No association was observed between DAS28 and cIMT in men. When studying the effect on cIMT of DAS28 categorized in degrees of disease activity, adjusted analyses revealed that women with high disease activity had a 0.079 mm larger cIMT than women in remission ($p = 0.026$). No differences were observed either among the other categories or in men ([Fig 2](#)). In addition, the difference in cIMT observed between men and women was due to patients in remission because significant differences were observed in cIMT values in this group, with men in remission having a 0.134 mm higher cIMT compared

Table 1. General characteristics of RA patients overall and stratified by gender.

	RA (n = 214)	Female (n = 138)	Male (n = 76)	P value
Characteristics of the groups				
Gender-female (% , n)	64.5 (138)			
Age (years)	58(12)	57 (12)	59 (12)	0.55
Body mass index (kg/m ²)	27.8 (5.9)	27.7 (6.6)	28.1 (4.4)	0.62
Waist circumference (cm)	93 (15)	88 (15)	100 (12)	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	137 (21)	135 (21)	142 (21)	0.024
Diastolic blood pressure (mmHg)	81 (12)	80 (13)	84 (12)	0.025
LDL cholesterol (mg/dL)	119 (31)	118 (31)	120 (31)	0.75
HDL cholesterol (mg/dL)	66 (19)	72 (18)	54 (15)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	105 (55)	102 (54)	112 (58)	0.21
Glucose (mg/dL)	95 (23)	94 (25)	96 (18)	0.35
Current smoker (% , n)	26.2(56)	27.5(38)	23.7(18)	0.34
Hypertension (% , n)	60.3 (129)	53 (73)	74 (56)	0.003
Diabetes mellitus (% , n)	11.7 (25)	10.9 (15)	13.2 (10)	0.62
Dyslipidaemia (% , n)	41.1(88)	39.1 (54)	44.7 (34)	0.425
Disease features				
Disease duration (years)	9.4 (9.1)	10.1 (9.9)	8.2 (7.5)	0.12
DAS28	3.5 (1.3)	3.7 (1.3)	2.98 (1.1)	<0.001
Disease remission (% , n)	27.1 (58)	20.3 (28)	39.5 (30)	<0.001
Low disease activity (% , n)	18.7 (40)	14.5 (20)	26.3 (20)	
Moderate disease activity (% , n)	44.4 (95)	52.2 (72)	30.3 (23)	
High disease activity (% , n)	9.8 (21)	13 (18)	3.9 (3)	
HAQ	0.45 (0.52)	0.59 (0.56)	0.21 (0.34)	<0.001
Rheumatoid factor+ (% , n)	72.4 (155)	71.7 (99)	73.7 (56)	0.76
ACPA+ (% , n)	81.3 (174)	83.3 (115)	77.6 (59)	0.31
ESR (mm/h)	37 (26)	40 (27)	32 (22)	0.019
CRP (mg/dL)	0.72 (0.83)	0.73 (0.80)	0.70 (0.88)	0.83
Fibrinogen (mg/dL)	443 (97)	442 (96)	444 (100)	0.91
Treatments (% , n)				
DMARDs	75.2 (161)	71.7 (99)	81.6 (62)	0.11
Biological agent	20.1 (43)	23.2 (32)	14.5 (11)	0.13
NSAIDs	57 (122)	57.2 (79)	56.6 (43)	0.92
Corticosteroids	50.9 (109)	53 (73)	47 (36)	0.44

HAQ = health assessment questionnaire index, ACPA = citrullinated anti-cyclic peptide antibodies, ESR = erythrocyte sedimentation rate, CRP = C-reactive protein, DAS28 = disease activity score, DMARDs = disease-modifying antirheumatic drugs, NSAIDs = non-steroidal anti-inflammatory drugs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.t001>

with women in remission ($p = 0.003$). In this group, gender explained a significant 8.7% of the cIMT variability. Active patients did not exhibit differences in cIMT values (Fig 2). No other clinical or analytical variable related to RA disease exhibited a significant association with cIMT.

Next, regarding the presence of carotid artery plaques in RA patients, we observed that 43% had carotid plaques, with a significantly increased prevalence in men compared with women (Table 2). Furthermore, stepwise logistic regression analysis revealed that the variables significantly associated with the presence of atherosclerotic plaques were age, smoking, HAQ, RF+, and ESR. Table 4 presents the odds ratio (OR) associated with each of these variables. Age, smoking, ESR, and RF+ were associated with an increased likelihood for the presence of

Table 2. Association of gender and age with sonographic measurements.

A. Sonographic measures		RA	Female	Male	p-value	
1-cIMT (mm)		0.645 (0.117)	0.627 (0.15)	0.678 (0.129)	0.005	
2-Plaque presence (%), n		43.5 (93)	36.2 (50)	56.6 (43)	0.004	
B. cIMT		Coefficients			R ² (%)	p-value
		β	SE	95% CI		
	Adjusted model				37	0.0001
	Gender	0.059	0.017	0.025–0.093	3.8	0.001
	Age	0.0048	0.00067	0.0035–0.0061	16	0.0001

(A1). Mean cIMT values in overall RA patients and divided by gender. ANOVA statistics for gender association with cIMT. (A2). Percentage of plaque presence in overall RA population and divided by gender. Chi-squared statistics for gender association with plaque presence. (B). Adjusted β linear regression estimates of the effect of age and male gender on cIMT applied to the overall population. The model is adjusted for disease duration, body mass index, ischaemic heart disease, ictus, peripheral artery disease, creatinine, hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, disease-modifying antirheumatic drugs, biological agents, corticosteroids, and non-steroidal anti-inflammatory drugs.

SE = standard error.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.t002>

plaques, whereas HAQ was associated with a reduction in this probability. All these variables explained 40% of the plaque presence variability.

Discussion

In our study, we evaluated the relationship of cIMT with disease activity in conjunction with age and gender in a sample of 214 patients with RA. We observed a complex relationship

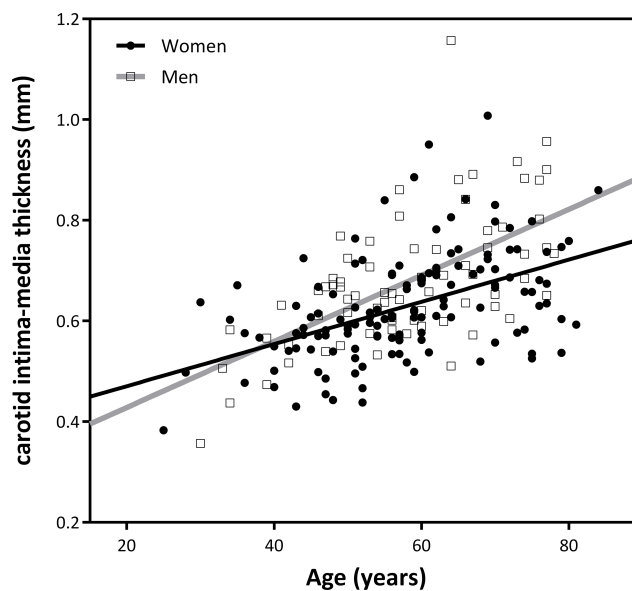


Fig 1. Correlation between age and carotid intima-media thickness (cIMT) by gender.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.g001>

Table 3. Association of DAS28 with cIMT.

DAS28	Men	Women
β coefficient	0.0043	0.021
SE	0.015	0.0085
95% CI	-0.026–0.035	0.0035–0.037
R ² (%)	0.1	3
p-value	0.78	0.018

Adjusted β linear regression estimates of the effect of DAS28 on cIMT applied to men and women. The model is adjusted for disease duration, body mass index, ischaemic heart disease, ictus, peripheral artery disease, creatinine, hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, disease-modifying antirheumatic drugs, biological agents, corticosteroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs and age. SE = standard error.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.t003>

among these variables and cIMT. In particular, we observed that males with RA had increased cIMT values compared with women, but these differences were due to patients in remission. As the disease activity increased, these differences disappeared, and the cIMT values of women became similar to those of men. In addition, women with high disease activity exhibited significantly increased cIMT values compared with women in remission; this result was not observed in men. Although different studies have evaluated the association between DAS28 and cIMT, the results are inconclusive. Thus, both studies with significant associations [7,23] and those with no associations between these variables have been described [24]. However, in contrast to our study, these studies did not evaluate the effect of gender among these associations, which could explain the discrepancies between studies. In our study, DAS28 was significantly associated with cIMT in women, significantly explaining 3% of the cIMT variability. Our results and others have demonstrated significantly higher DAS28 and HAQ values in females than in males, which could be justified both by the greater perception of pain and reduced muscle strength of females and the overestimation of functional capacity in males

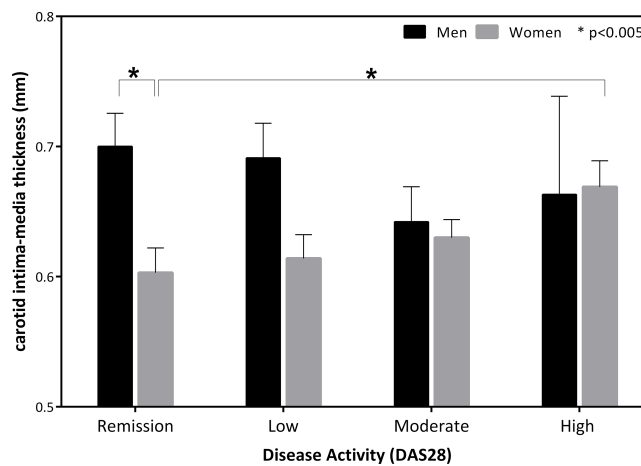


Fig 2. Effects of degrees of disease activity on carotid intima-media thickness (cIMT) by gender.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.g002>

Table 4. Estimates of the effect of significant variables on plaque presence.

Significant variables	OR	95% CI		R ² (%)
Age	1.094	1.05	1.14	40
Smoking	3.66	1.68	8.03	
RF+	2.29	1.02	5.14	
HAQ	0.34	0.15	0.75	
ESR	1.017	1.00	1.03	

Adjusted OR estimates were assessed using stepwise logistic regression analysis applied to the overall population. R² is calculated for all five variables.

HAQ = health assessment questionnaire index, ESR = erythrocyte sedimentation rate, and RF = rheumatoid factor.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193690.t004>

[25]. Furthermore, low DAS28 has been suggested as the cause of the lack of differences in cIMT between RA patients and controls that is observed in some studies [16,18,19].

In addition, we observed a significant interaction between age and gender. We observed a 12% significantly more pronounced correlation of age with cIMT in men compared with women. To the best of our knowledge, these data are reported for the first time. These results suggest a more rapid rate of cIMT thickening in men with RA than in women as age increases. The adjusted model (Table 2B) for our entire population of RA patients significantly explains a maximum of 37% of the variability of cIMT; thus, there is room for progress in the evaluation of new markers associated with cIMT in these patients.

In our study, we observed no significant association between the inflammatory variables (CRP, ESR and fibrinogen) and serological markers (RF+, ACPA+) studied and cIMT. Several publications have reported significant associations between these variables [8,10,26,27,23,28–34]. For instance, Ruscitti et al. reported that inflammatory burden together with systemic arterial hypertension, metabolic syndrome, and lack of clinical response are significantly correlated with an increased risk of developing new subclinical atherosclerosis [35,36]. However, negative results have also been reported, and low levels of inflammation have been suggested to be due to a timely assessment of inflammation that would not adequately reflect the fluctuating levels of inflammation characteristic of RA and the interactions of drugs as potential causes of these results [4,13,37–41].

The association between classical lipid profile values (LDLc, TG, and HDLc) and subclinical atherosclerosis is not well determined. Although positive associations have been reported [42]; other studies, including our own, have not reported such associations [16,43]. Given the evidence that inflammation is associated with both quantitative and qualitative changes in lipoproteins [44–46], static measures of classical lipid values might not be sufficient, and advanced measures (i.e., sizes and concentrations of lipid subfractions, compositional changes and functionality) are necessary to provide clinically useful information.

The presence of carotid plaques is considered a good predictor of CV risk. In our study, 43% of RA patients had carotid plaques, which is slightly higher than the 33% described in a meta-analysis of 35 studies [10]. In addition, variables significantly associated with the presence of atherosclerotic plaques in our RA patients were age, smoking, HAQ, ESR and RF+. These results do not disagree with different published studies [8,47,48]; however, discordant results are also presented [24,49]. Surprisingly, unlike previously described values [8,50], the HAQ values in our RA patients correlated positively with a reduced risk of presenting atherosclerotic plaques. This result could be explained by the cross-sectional design of the study, the lack of radiographic analysis of the damage or the subjective nature of this parameter.

The observed differences between some of the variables that are associated with cIMT and the presence of plaques could be explained if we take into account that cIMT and atherosclerotic plaques reflect different stages and pathophysiological processes of atherosclerosis [51,52]. Thus, cIMT represents the thickening of the muscular layer of the media, whereas plaque formation is a result of the thickening of the intima. In addition, plaque formation is considered a late stage in the atherosclerotic process, progressing from the initial fatty streak to an advanced atheromatous plaque [53].

cIMT is an independent predictor of cardiovascular events and for this reason it has been considered as a tool to improve the estimation of cardiovascular risk. However, its application in the clinical practice is still a matter of debate and is limited by the lack of positive results in interventional studies and clinical trials aimed to correlate cIMT regression with the improvement in cardiovascular survival.

In conclusion, in our cohort of patients with RA, disease activity measured according to DAS28 and age are associated with cIMT differentially in men and women. Our results may help to explain why DAS28 is not always associated with subclinical atherosclerosis. In addition, gender differences influencing cIMT could be justified by the increased incidence of RA in women and by factors intrinsic to the female sex that are external to the autoimmune disease itself (i.e., genetic and hormonal factors) and could help clinicians to manage these patients.

Supporting information

S1 File. Data set.

(TXT)

Author Contributions

Conceptualization: Delia Taverner, Joan-Carles Vallvé, Antoni Castro.

Data curation: Joan-Carles Vallvé.

Formal analysis: Joan-Carles Vallvé.

Funding acquisition: Delia Taverner.

Investigation: Delia Taverner, Joan-Carles Vallvé, Raimón Ferré, Silvia Paredes.

Methodology: Delia Taverner, Joan-Carles Vallvé, Raimón Ferré, Silvia Paredes.

Project administration: Joan-Carles Vallvé.

Supervision: Joan-Carles Vallvé, Lluís Masana, Antoni Castro.

Validation: Joan-Carles Vallvé, Antoni Castro.

Visualization: Lluís Masana.

Writing – original draft: Delia Taverner, Joan-Carles Vallvé.

Writing – review & editing: Delia Taverner, Joan-Carles Vallvé, Raimón Ferré, Lluís Masana, Antoni Castro.

References

1. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 54–8. <https://doi.org/10.1002/art.10705> PMID: 12528103

2. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etrminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2008; 59: 1690–7. <https://doi.org/10.1002/art.24092> PMID: 19035419
3. Castañeda S, Martín-Martínez MA, González-Juanatey C, Llorca J, García-Yébenes MJ, Pérez-Vicente S, et al. Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Semin Arthritis Rheum*. 2015; 44: 618–26. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.12.002> PMID: 26058345
4. van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: 1395–400. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.094151> PMID: 18697775
5. Meune C, Touzé E, Trinquart L, Allanore Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2010; 103: 253–61. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2010.03.007> PMID: 20656636
6. Stevens RJ, Douglas KMJ, Saratzis AN, Kitas GD. Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med*. 2005; 7: 1–24. <https://doi.org/10.1017/S1462399405009154> PMID: 15876361
7. Tanasescu C, Jurcut C, Jurcut R, Ginghina C. Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. *Eur J Intern Med*. 2009; 20: 348–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2008.09.005> PMID: 19524171
8. Im CH, Kim NR, Kang JW, Kim JH, Kang JY, Bae GB, et al. Inflammatory burden interacts with conventional cardiovascular risk factors for carotid plaque formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015; 54: 808–15. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu376> PMID: 25305139
9. Kerekes G, Soltész P, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Turiel M, Végh E, et al. Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8: 224–34. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.16> PMID: 22349611
10. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MND. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemost*. 2015; 113: 916–30. <https://doi.org/10.1160/TH14-11-0921> PMID: 25716931
11. Scarno A, Perrotta FM, Cardini F, Carboni A, Annibali G, Lubrano E, et al. Beyond the joint: Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *World J Orthop*. 2014; 5: 328–35. <https://doi.org/10.5312/wjo.v5.i3.328> PMID: 25035836
12. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Carotid intima-media thickness predicts the development of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2009; 38: 366–71. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.01.012> PMID: 18336869
13. Carotti M, Salaffi F, Mangiacotti M, Cerioni A, Giuseppetti GM, Grassi W. [Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: the role of high-resolution B mode ultrasound in the measurement of the arterial intima-media thickness]. *Reumatismo*. 59: 38–49. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435841> PMID: 17435841
14. Mohan A, Sada S, Kumar BS, Sarma KVS, Devi BV, Rao PVLNS, et al. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis by utilizing carotid intima-media thickness as a surrogate marker. *Indian J Med Res*. 2014; 140: 379–86. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4248384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> PMID: 25366205
15. van Sijl AM, Peters MJ, Knol DK, de Vet HC, Gonzalez-Gay MA, Smulders YM, et al. Carotid intima media thickness in rheumatoid arthritis as compared to control subjects: a meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2011; 40: 389–97. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2010.06.006> PMID: 20889191
16. van Breukelen-van der Stoep DF, van Zeven D, Klop B, van de Geijn G-JM, Janssen HJW, Hazes MJMW, et al. Association of Cardiovascular Risk Factors with Carotid Intima Media Thickness in Patients with Rheumatoid Arthritis with Low Disease Activity Compared to Controls: A Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2015; 10: e0140844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140844> PMID: 26485681
17. García Díaz J de D, López de Guzmán A, Díez-Pérez de la Vacas MI, Cuende Quintana E, Sánchez Atrio A. [Determinants of carotid subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A case-control study]. *Med clínica*. 2008; 130: 210–2. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346410>
18. Ristić GG, Lepić T, Glisić B, Stanisavljević D, Vojvodić D, Petronijević M, et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness: impact of anti-inflammatory treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49: 1076–81. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep456> PMID: 20208070
19. Arts EEA, Fransen J, den Broeder AA, Popa CD, van Riel PLCM. The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74: 998–1003. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204531> PMID: 24458537

20. Liao L-J, Cho T-Y, Huang T-W. Assessment of carotid artery intima-media thickness in patients with obstructive sleep apnoea. *Clin Otolaryngol*. 2017; <https://doi.org/10.1111/coa.12823> PMID: 28052522
21. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, et al. Carotid artery intima-media thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *ARIC Investigators*. *Stroke*. 1993; 24: 1297–304. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8362421> PMID: 8362421
22. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness and Plaque Consensus (2004–2006–2011). *Cerebrovasc Dis*. 2012; 34: 290–296. <https://doi.org/10.1159/000343145> PMID: 23128470
23. Hannawi S, Haluska B, Marwick TH, Thomas R. Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: R116. <https://doi.org/10.1186/ar2323> PMID: 17986352
24. Pereira IA, Laurindo IMM, Zimmermann AF, Werner Castro GR, Mello F, Borba EF. Single measurements of C-reactive protein and disease activity scores are not predictors of carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients. *Acta Reum Port*. 34: 58–64. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449480>
25. Ahlmén M, Svensson B, Albertsson K, Forslind K, Hafström I, BARFOT Study Group. Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69: 230–3. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.102244> PMID: 19158113
26. Del Rincón I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 1833–40. <https://doi.org/10.1002/art.11078> PMID: 12847676
27. Ristić GG, Lepić T, Glisić B, Stanisavljević D, Vojvodić D, Petronijević M, et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness: impact of anti-inflammatory treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49: 1076–81. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep456> PMID: 20208070
28. Ahmed HMMS, Youssef M, Mosaad YM. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein are associated with subclinical atherosclerosis in recent-onset rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2010; 29: 1237–43. <https://doi.org/10.1007/s10067-010-1436-0> PMID: 20354747
29. Ajeganova S, de Faire U, Jogestrand T, Frostegård J, Hafström I. Carotid atherosclerosis, disease measures, oxidized low-density lipoproteins, and atheroprotective natural antibodies for cardiovascular disease in early rheumatoid arthritis—an inception cohort study. *J Rheumatol*. 2012; 39: 1146–54. <https://doi.org/10.3899/jrheum.111334> PMID: 22589258
30. Vázquez-Del Mercado M, Nuñez-Atahualpa L, Figueroa-Sánchez M, Gómez-Bañuelos E, Rocha-Muñoz AD, Martín-Márquez BT, et al. Serum levels of anticyclic citrullinated peptide antibodies, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and C-reactive protein are associated with increased carotid intima-media thickness: a cross-sectional analysis of a cohort of rheumatoid arthritis patient. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 342649.
31. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Piñeiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005; 32: 1219–23. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996055> PMID: 15996055
32. Gerli R, Bartoloni Bocci E, Sherer Y, Vaudo G, Moscatelli S, Shoenfeld Y. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies with subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67: 724–5. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.073718> PMID: 18408112
33. 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; 34: 2706–16. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304475> PMID: 25256232
34. Targońska-Stepniak B, Drelich-Zbroja A, Majdan M. The relationship between carotid intima-media thickness and the activity of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2011; 17: 249–55. <https://doi.org/10.1097/RHU.0b013e3182290dbf> PMID: 21778898
35. Ruscitti P, Cipriani P, Masedu F, Romano S, Berardicurti O, Liakouli V, et al. Increased Cardiovascular Events and Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis Patients: 1 Year Prospective Single Centre Study. Feng Y-M, editor. *PLoS One*. 2017; 12: e0170108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170108> PMID: 28103312
36. Ruscitti P, Margiotta DPE, Macaluso F, Iacono D, D'Onofrio F, Emmi G, et al. Subclinical atherosclerosis and history of cardiovascular events in Italian patients with rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96: e8180. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008180> PMID: 29049200

37. Kameda Y, Inaba M, Goto H, Nagata M, Henmi Y, Furumitsu Y, et al. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 1489–97. <https://doi.org/10.1002/art.10269> PMID: 12115178
38. Jonsson SW, Backman C, Johnson O, Karp K, Lundström E, Sundqvist KG, et al. Increased prevalence of atherosclerosis in patients with medium term rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001; 28: 2597–602. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764203> PMID: 11764203
39. El-Barbary AM, Kassem EM, El-Sergany MAS, Essa SA-M, Eltomey MA. Association of anti-modified citrullinated vimentin with subclinical atherosclerosis in early rheumatoid arthritis compared with anti-cyclic citrullinated peptide. *J Rheumatol.* 2011; 38: 828–34. <https://doi.org/10.3899/jrheum.101143> PMID: 21362765
40. Sung JH, Lee JE, Samdarshi TE, Nagarajaro HS, Taylor JK, Agrawal KK, et al. C-reactive protein and subclinical cardiovascular disease among African-Americans: (the Jackson Heart Study). *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2014; 15: 371–6. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32836411d6> PMID: 24751480
41. Sandoo A, Chanchlani N, Hodson J, Smith JP, Douglas KM, Kitas GD. Classical cardiovascular disease risk factors associate with vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a six-year prospective study. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15: R203. <https://doi.org/10.1186/ar4396> PMID: 24289091
42. Tutoglu A, Boyaci A, Boyaci N, Kaya Z, Aridici R, Koca I. Is There Any Relationship between Joint Destruction and Carotid Intima-media Thickness in Patients with Rheumatoid Arthritis? *J Phys Ther Sci.* 2014; 26: 1093–6. <https://doi.org/10.1589/jpts.26.1093> PMID: 25140104
43. Akrouf R, Fourati H, Mnif E, Ben Mahfoudh KH, Hachicha I, Ezzeddine M, et al. [Increased cardiovascular risk and premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis]. *Ann Cardiol d'angiologie.* 2012; 61: 267–73.
44. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2761–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762936> PMID: 11762936
45. Hahn BH, Grossman J, Ansell BJ, Skaggs BJ, McMahon M. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10: 213. <https://doi.org/10.1186/ar2471> PMID: 18828865
46. Pope JE, Nevskaya T, Barra L, Parraga G. Carotid Artery Atherosclerosis in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: Predictors of Plaque Occurrence and Progression Over 24 Weeks. *Open Rheumatol J.* 2016; 10: 49–59. <https://doi.org/10.2174/1874312901610010049> PMID: 27857821
47. Corrales A, Dessein PH, Tsang L, Pina T, Blanco R, Gonzalez-Juanatey C, et al. Carotid artery plaque in women with rheumatoid arthritis and low estimated cardiovascular disease risk: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17: 55. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0576-7> PMID: 25888724
48. Zampeli E, Protopogou A, Stamatelopoulos K, Fragiadaki K, Katsiari CG, Kyrou K, et al. Predictors of new atherosclerotic carotid plaque development in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R44. <https://doi.org/10.1186/ar3757> PMID: 22390577
49. van den Oever IAM, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013; 5: 166–81. <https://doi.org/10.1177/1759720X13491025> PMID: 23904862
50. Cuomo G, Di Micco P, Niglio A, La Montagna G, Valentini G. [Atherosclerosis and rheumatoid arthritis: relationships between intima-media thickness of the common carotid arteries and disease activity and disability]. *Reumatismo.* 56: 242–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643478> PMID: 15643478
51. Adams MR, Nakagomi A, Keech A, Robinson J, McCredie R, Bailey BP, et al. Carotid intima-media thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease. *Circulation.* 1995; 92: 2127–34. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554192> PMID: 7554192
52. Spence JD. Ultrasound measurement of carotid plaque as a surrogate outcome for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2002; 89: 10B–15B; discussion 15B–16B. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879661> PMID: 11879661
53. Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation Between Carotid Intimal/Medial Thickness and Atherosclerosis: A Point of View From Pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 177–181. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.173609> PMID: 19679833

3.2 ASSESMENT OF ARTERIAL STIFFNESS VARIABLES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: A MEDIATION ANALYSIS.

Scientific Reports 2019;9(1):4543

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Assessment of arterial stiffness variables in patients with rheumatoid arthritis: A mediation analysis

Received: 1 August 2018
Accepted: 26 February 2019
Published online: 14 March 2019

Delia Taverner¹, Silvia Paredes¹, Raimon Ferré³, Lluís Masana³, Antoni Castro³ & Joan-Carles Vallvé²

We aimed to study arterial stiffness variables in patients with rheumatoid arthritis (RA), specifically considering their associations with path model mediation analysis. We examined arterial stiffness expressed by the pulse wave velocity (PWV), augmentation index (AIx), distensibility, and clinical and biochemical characteristics in a cohort of 214 RA patients. Variable associations were analysed using multivariate linear regression analysis. We also used path model mediation analysis for PWV variable. Our results indicate that age, systolic blood pressure (SBP), and body mass index (BMI) were significantly associated with PWV, and collectively accounted for 32% of PWV variability. The parallel mediation analysis showed that SBP and BMI accounted for 21% and 7% (a total of 28%) of the total effect of age on PWV, respectively, indicating a partial mediation effect. The associated variables with AIx were age and tender joint count, while those with distensibility were BMI and sex, overall accounting for 16.5% and 4.7% of the variation in AIx and distensibility, respectively. We observed no associations of arterial stiffness with inflammatory variables, disease activity and duration, or cholesterol levels. In conclusion, in our population of RA patients, age is the most important variable that determines the increase in PWV. We have also shown that a significant proportion of the negative effects of age on PWV occurs through increases in SBP and BMI. In our study, lipid and inflammation variables were not associated with an increase in arterial stiffness.

The increase in cardiovascular risk (CV) is currently one of the most important causes of comorbidities in patients with rheumatoid arthritis (RA)^{1,2}. The chronic inflammation that acts as an independent risk factor for CV³ seems to increase the morbidity and CV mortality of these patients^{4,5}.

Increased arterial stiffness is one of the earliest stages of atherosclerosis⁶ and the measurement of pulse wave velocity (PWV) is widely accepted as a precise and non-invasive method to assess arterial stiffness in humans⁷. While the PWV directly measures the arterial elasticity of the great vessels⁸, the augmentation index (AIx) is a more complex parameter that depends on both vascular elasticity and peripheral resistance.

An additional parameter used to measure arterial stiffness is carotid distensibility, which measures the ability of the artery to expand and contract during cardiac pulsation and relaxation⁹. These indices are frequently used as surrogate CVD endpoints in clinical studies since they provide non-invasive measures that reflect early effects of several stimuli on the arterial wall¹⁰.

In recent years, there has been a growing interest in the relationship between PWV, AIx, and RA due to reports that an increase in these markers of arterial stiffness suggests endothelial dysfunction. Some case-control studies reported increased arterial stiffness in RA patients^{11–13}. In these studies, associations with variables that are characteristic of the disease such as disease duration^{14,15}, inflammatory variables^{16–19}, and disease activity^{16,20–22} have been demonstrated, although arterial stiffness has also been correlated with age^{19,23,24} and SBP^{23–25}. There are few

¹Secció de Reumatologia, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain. ²Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain. ³Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Catalonia, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-C.V. (email: jc.vallve@urv.cat)

published studies that have evaluated distensibility as a marker of arterial stiffness in RA²⁶, and the results of these studies are similar to those obtained for PWV and AIx. However, these findings were in contrast to those of other publications, which demonstrates the need for additional studies and meta-analyses to provide information about these associations^{11,17,27}. Furthermore, others and we have evaluated subclinical atherosclerosis in RA^{28–30} but the relationship of arterial stiffness parameters in individuals with subclinical atherosclerosis has shown differing results^{31,32}.

The aim of this study was to describe the association between arterial stiffness as measured by PWV, AIx, and carotid distensibility by specifically considering the relationship between the characteristics of the disease and lipid profiles within a population of RA patients, as well as mediating variables that might affect that relationship. Additionally, we sought to determine if there was a relationship between arterial stiffness, cIMT, and carotid plaque presence in RA patients.

Materials and Methods

The AR population of the present study has been described in a previous paper³⁰. Briefly, the 1987 American College of Rheumatology criteria for RA diagnosis were used to select patients who attended the University Hospital Sant Joan de Reus via external consultation. 214 patients between 20 and 80 years of age were included in the study. The clinical research Ethics Committee of the University Hospital Sant Joan approved the study and we executed the investigation in accordance with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration.

We informed patients about the research nature of the study and they provided written informed consent prior to participation. Patients were included from September 2011 to November 2014 and on the same day of the visit, fasted blood extraction and carotid ultrasound were carried out.

Laboratory measurements. Fasting venous blood samples were obtained in EDTA tubes from 214 patients. Analytical variables including hemogram, general biochemistry, glycated haemoglobin, thyrotropin, albumin, and lipid profile [triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), high-density lipoprotein cholesterol (HDLc), and very-low-density cholesterol (VLDLc)] were determined by enzymatic methods. Measurement of apolipoproteins A1 and B were carried out by immunonephelometry and lipoprotein (a) by an enzyme-linked immunosorbent assay. Standard laboratory methods were used to quantify rheumatoid factor (RF), citrullinated anti-cyclic peptide antibodies (ACPA), antinuclear antibodies, and inflammatory markers [erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), and fibrinogen]. RF positive (RF+) was defined by values of RF >20 and positive ACPA (ACPA+) was defined by ACPA values >1. Dyslipemia was defined as having HDLc <50 mg/dL for women or <40 mg/dL for men, or TG >150 mg/dL, or LDLc >100 mg/dL or in treatment with statins or other hypocholesterolemic drugs.

Clinical evaluation. We obtained information about the classical CV risk factors (smoking, hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia), the use of hypolipidaemic, hypoglycaemic, or antiplatelet drugs, and history of CV events. Additionally, we performed measurements of body weight, height, body mass index (BMI), waist circumference (WC), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and joint physical examinations of RA. The disease activity score (DAS28) calculated according to the ESR was obtained as a measure of disease activity. Determination of swollen and tender joint counts were also obtained (TJC, SJC respectively). The 0–10 visual analogue scale and the health assessment questionnaire (HAQ) index were used as a measure of pain and disability, respectively.

Ultrasound evaluation of arterial stiffness and intima-media thickness. Arterial stiffness expressed by the pulse wave velocity, carotid distensibility and augmentation index was measured directly at both common carotid arteries using the ultrasound linear probe (5–12 MHz) as a tonometer and analysed *in vivo* by the Quality Arterial Stiffness (QAS®) radiofrequency software (Esaote SpA, Genova, Italy). Radiofrequency (RF) Signal-based Vascular Ultrasound from Esaote employs RF signal-based technology and includes QAS measurement. The RF signal is a reflected ultrasound signal that is captured by the transducer and converted in an electric signal preserving all the characteristics of the acoustic wave in terms of amplitude and phase. Local arterial stiffness is estimated as systo-diastolic changes in arterial diameter/area over systo-diastolic changes in distending pressure (pulse pressure). Maximum and minimum carotid diameters were acquired using the attained distension curves, and vascular stiffness parameters were calculated after calibration for blood pressure^{33,34}. Carotid distensibility was the change in diameter of the carotid artery secondary to intravascular volume expansion caused by the left ventricle systole. The pulse wave velocity was obtained from brachial blood pressure and the accurate measurements of diameter and change in diameter of carotid arteries. Augmentation index was measured by the pulse wave analyses and local pressure. Final values were the median measurements of the right and left carotid arteries^{35,36}.

Carotid intima-media thickness (cIMT) was measured with a My Lab 50X-Vision sonographer (Esaote SpA, Genova, Italy) with a linear array ultrasound probe small parts broadband transducer (5–12 MHz). The far wall of the common carotid artery (1 cm proximal to the bifurcation), the bifurcation, and the internal carotid artery of the left and right carotid arteries were identified. We measured cIMT *in vivo* at the predefined points using the QIMT® radiofrequency image processing software (Esaote SpA, Genova, Italy). We defined pathological cIMT as the 75th percentile of cIMT values in the general population banded with respect to age and sex, and plaque as a focal structure encroaching into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding IMT value, or a thickness >1.5 mm. A single operator obtained and measured the images in order to reduce variability.

Statistical Analysis. Statistical software SPSS, version 23 was used to analyse all data. Continuous variables are presented as the mean (standard deviation), and categorical variables are presented as the percentage (number of individuals). Bivariate correlations were estimated using the Pearson correlation coefficient "r". Multiple

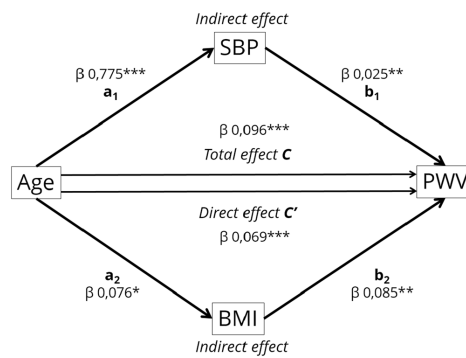


Figure 1. Path model diagram with the results of parallel mediation analysis. Path model showing the effect of age on the PWV as mediated simultaneously by SBP and BMI. Total β effect (path c) represents the effect of age on PWV with no mediators in the model. Direct β effect (path c') represents the effect of age on PWV when SBP and BMI mediators are included in the model. Indirect effects (path a₁b₁ or path a₂b₂) represent the effect of age on PWV through SBP or BMI respectively. The figure shows unstandardized β regression coefficients (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

linear regression with univariate and multivariate models were used to estimate PWV, AIX, and distensibility variables. We initially selected clinically relevant variables and known confounders for inclusion in the multivariable regression analysis, and the iterative process of variable selection was performed using stepwise logistic regression analysis. Data for AIX was only available for 128 RA patients. The effect of disease activity degree was assessed by interaction analyses. Interaction terms of the four levels of DAS28 (remission, low, moderate, and high disease activity) with the variables to be tested were added in the linear regression models. The interaction terms were considered significant when significantly improved the variability of the dependent variable explained by the model. Mediation analysis was used to further understand the association between age and PWV through the use of the Hayes macro-application "PROCESS" for SPSS³⁷. Specifically, we used a parallel mediation model (model number 4 in Hayes macro) to examine total, direct, and indirect effects of age on PWV (Fig. 1). The path coefficients are the beta (β) coefficients of the multivariable regression models and represent the magnitude and direction of associations between variables included in the model. The total β effect (path c) represents the effect of age on PWV when no other mediators are included in the model, while the direct β effect (path c') represents the effect of age on PWV when mediators are included. Finally, indirect effects (path a₁b₁ and path a₂b₂) represent the effect of age on PWV through SBP or BMI, respectively. If the indirect effects path is statistically significant, it can be concluded that mediation has occurred. The significance of indirect effects are tested by bootstrapped 95% confidence intervals (CI). Process macro produces bootstrap estimates and bias-corrected 95% confidence intervals (CIs) for the indirect effect, and a 95% CI that does not cross zero indicates a statistically significant indirect. The effect size for mediation analysis was measured with percent mediation ($P_{\%}$) interpreted as the percent of the total effect (path c) accounted for by the indirect effects (path a₁b₁ or path a₂b₂). For the other tests, a p -value of < 0.05 was considered statistically significant.

Ethical approval and informed consent. The study was approved by the clinical research Ethics Committee of the University Hospital Sant Joan and it was carried out in accordance with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration. Patients were informed of the research nature of the study and provided written informed consent prior to participation.

Results

We included 214 patients with RA in the study. Table 1 shows the general characteristics of the cohort included. Mean (SD) age and disease duration were 58 (12) and 9.4 (9.1), respectively. Female patients represented 64.5% of the cohort; 60% of patients were hypertensive, 11.7% were diabetic, 41% were dyslipidaemic, and 26% were smokers. The percentage of patients in remission or with low, moderate or high disease activity were 27, 19, 44, and 10, respectively.

Disease-modifying antirheumatic drugs were administered to 75% of the patients which included 20% of patients receiving biological drugs, 57% receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs, and/or 51% receiving corticosteroids.

Crude analysis of the ultrasonographic variables showed that ESR, BMI, age, and DBP were significantly correlated with PWV and distensibility, while SBP was only correlated with PWV. Moreover, PWV was significantly correlated with disease duration, CRP, LDLc, TG, glucose, and HbA1c (Table 2). Finally, AIX was significantly correlated with disease duration, HDLc, age, and SBP (Table 2). Nevertheless, many of these bivariate correlations no longer remained significant after adjustment for confounder variables in multivariate models (shown below). Thus, stepwise multivariable linear regression analysis showed that the variables significantly associated with

	RA (n = 214)
Characteristics of the groups	
Sex-female (% , n)	64.5 (138)
Age (years)	58 (12)
Body mass index (kg/m ²)	27.8 (5.9)
Waist circumference (cm)	93 (15)
Systolic blood pressure (mmHg)	137 (21)
Diastolic blood pressure (mmHg)	81 (12)
LDL cholesterol (mg/dL)	119 (31)
HDL cholesterol (mg/dL)	66 (19)
Triglycerides (mg/dL)	105 (55)
Glucose (mg/dL)	95 (23)
Current smoker (% , n)	26.2 (56)
Hypertension (% , n)	60.3 (129)
Diabetes mellitus (% , n)	11.7 (25)
Dyslipidemia (% , n)	41.1 (88)
Disease features	
Disease duration (years)	9.4 (9.1)
DAS28	3.5 (1.3)
Disease Remission (% , n)	27.1 (58)
Low disease activity (% , n)	18.7 (41)
Moderate disease activity (% , n)	44.4 (95)
High disease activity (% , n)	9.8 (21)
HAQ	0.45 (0.52)
Rheumatoid factor + (% , n)	72.4 (155)
ACPA + (% , n)	81.3 (174)
ESR (mm/h)	37 (26)
CRP (mg/dL)	0.72 (0.83)
Fibrinogen (mg/dL)	443 (97)
Treatments (% , n)	
DMARDs	75.2 (161)
Biological agent	20.1 (43)
NSAIDs	57 (122)
Corticosteroids	50.9 (109)

Table 1. General characteristics of RA patients. HAQ; health assessment questionnaire index, ACPA; citrullinated anti-cyclic peptide antibodies, ESR; erythrocyte sedimentation rate, CRP; C-reactive protein, DAS28; disease activity score, DMARDs; disease-modifying antirheumatic drugs, NSAIDs; non-steroidal anti-inflammatory drugs.

PWV were age ($\beta = 0.069$; $p = 0.0001$), SBP ($\beta = 0.022$; $p = 0.0003$), and BMI ($\beta = 0.078$; $p = 0.0002$), collectively explaining 32% of PWV variability ($R^2 = 0.32$; $p < 0.0001$). No other variable was associated with PWV. Then we tested the heterogeneity in disease activity degree of our population by interaction analyses between DAS28 and age, SBP, and BMI. When we added the different interaction terms in the model, we observed no significant effects of those terms on the variability of PWV explained by the model (Supplemental Table 1).

To further explore the relationships between age, SBP, and BMI with PWV, we performed a parallel mediation analysis (Fig. 1; Table 3). The model showed that the total effect of age (c pathway) on the dependent variable (PWV) was mediated by SBP (a_1b_1 indirect pathway) and by BMI (a_2b_2 indirect pathway). Thus, age was positively associated with SBP (path a_1) and with BMI (path a_2). Additionally, SBP was also positively associated with PWV (path b_1), while BMI was positively associated with PWV (path b_2). Bootstrapping analysis revealed a significant indirect effect of age on PWV through SBP ($a_1b_1 = 0.0203$ (95% CI; 0.0082, 0.0338)) and through BMI ($a_2b_2 = 0.0065$ (95% CI; 0.0006, 0.0149)) as the 95% CI did not cross zero. The total indirect effect ($(a_1b_1) + (a_2b_2)$) was 0.0268, (95% CI; 0.0125, 0.0425) with a stronger contribution from SBP than from BMI. Combined, both mediators accounted for approximately 28% of the total effect of age ($P_M = 0.279$), with SBP accounting for 21% of the total effect ($P_M = 0.212$) and BMI accounting for 6.7% of the total effect ($P_M = 0.067$). The model also showed a significant direct effect (path c') of age on PWV indicating that the cumulative mediating effect of SBP and BMI was only partial (partial mediation), as the total effect of age on PWV was reduced (β coefficient changed from 0.096 to 0.069) but remained significant.

Stepwise multivariable linear regression analysis showed that BMI ($\beta = -3.31$; $p = 0.022$) and sex (β for men = 36.27; $p = 0.024$) were significantly associated with distensibility, accounting for 5.6% of overall distensibility variability ($R^2 = 0.056$; $p < 0.003$). Furthermore, stepwise multivariable linear regression analysis showed that age ($\beta = 0.14$; $p = 0.0001$) and TJC ($\beta = -0.33$; $p = 0.045$) were significantly associated with AIx, accounting

	Pulse wave velocity			Distensibility			Augmentation index		
	r	β	p	r	β	p	r	β	p
Disease duration (years)	0.118	0.001	0.048	-0.01	0.001	0.447	0.146	0.073	0.050
DAS28	0.010	0.001	0.442	-0.036	0.001	0.305	-0.008	-0.028	0.463
HAQ	0.031	0.006	0.33	-0.087	0.006	0.108	-0.029	-0.254	0.374
ESR (mm/h)	0.212	0.001	0.001	-0.139	0.001	0.024	0.049	0.009	0.293
CRP (mg/dL)	0.118	0.016	0.047	-0.065	0.016	0.177	-0.142	-0.843	0.056
Fibrinogen (mg/dL)	0.071	0.0008	0.159	-0.015	0.0001	0.415	0.005	0.0001	0.477
HDLc (mg/dL)	0.006	0.0001	0.465	0.018	0.0001	0.401	0.240	0.059	0.003
LDLc (mg/dL)	0.156	0.001	0.013	-0.043	0.001	0.272	0.079	0.012	0.188
Triglycerides (mg/dL)	0.132	0.0001	0.031	-0.009	0.0001	0.448	-0.008	-0.001	0.463
Age	0.514	0.005	0.0001	-0.140	0.005	0.023	0.371	0.152	0.0001
BMI (kg/m ²)	0.298	0.006	0.0001	-0.181	0.006	0.005	0.059	0.055	0.254
SBP (mmHg)	0.447	0.002	0.0001	-0.038	0.002	0.295	0.185	0.040	0.019
DBP (mmHg)	0.192	0.002	0.003	-0.140	0.002	0.023	0.059	0.021	0.255
Glucose (mg/dL)	0.199	0.001	0.002	-0.060	0.001	0.199	-0.001	0.0001	0.494
HbA1c (%)	0.177	0.024	0.006	0.001	0.024	0.492	0.013	0.065	0.443

Table 2. Correlations of arterial stiffness variables with clinical and analytical variables. r; spearman coefficient; p; p value; β ; univariate linear regression estimates. DAS28; disease activity score, HAQ; health assessment questionnaire index, ESR; erythrocyte sedimentation rate, CRP; C-reactive protein, HDLc; High-density lipoprotein cholesterol, LDLc; Low-density lipoprotein cholesterol, BMI; Body mass index, SBP; systolic blood pressure. Data for AIx was only available for 128 AR patients.

	Pulse Wave velocity (m/s)				
	β	SE	P value	95% CI	
				Lower	Upper
Age					
Total effect (path c)	0.096	0.0123	0.0001		
Direct effect (path c')	0.069	0.013	0.0001		
Age to SBP (path a ₁)	0.775	0.11	0.0001		
Age to BMI (path a ₂)	0.076	0.032	0.0182		
Total indirect effect	0.0268			0.0125	0.0425
SBP					
Direct effect (path b ₁)	0.025	0.0075	0.001		
Indirect effect (path a ₁ b ₁)	0.0203			0.0082	0.0338
BMI					
Direct effect (path b ₂)	0.085	0.026	0.001		
Indirect effect (path a ₂ b ₂)	0.0065			0.0006	0.0149

Table 3. Parallel mediator model summary. Data are obtained from PROCESS macro-application (37). Total β effect (path c) represents the effect of age on PWV with no mediators in the model. Direct β effect (path c') represents the effect of age on PWV when SBP and BMI mediators are included in the model. Indirect effects (path a₁b₁ or path a₂b₂) represent the effect of age on PWV through SBP or BMI respectively. SBP: systolic blood pressure; BMI: body mass index; SE: standard error; β : linear regression estimates.

for 16.5% of overall AIx variability ($R^2=0.165$; $p<0.0001$). No interaction effect of DAS28 on distensibility neither AIx was observed (Supplemental Table 1). We then checked for the association between PWV, distensibility, and AIx with cIMT and carotid plaque presence. We showed through multivariable regression analysis that there was no association of these variables with either cIMT or plaque presence (Supplemental Table 2).

Discussion

In this study, we evaluated PWV, AIx, and carotid distensibility as markers for arterial stiffness in a cohort of 214 patients with RA. Our results identified variables that were significantly associated with each marker: age, SBP, and BMI accounted for 32% of the overall variability in PWV; age and TJC accounted for 16.5% of the overall variability in AIx; and BMI and sex accounted for 5.6% of the overall variability in distensibility. In addition, interaction analyses shown that these associations did not change as a function of DAS28.

The clinical relevance of an increase in PWV and AIx can be understood more clearly when one considers that the risk of a major CV event increases by approximately 14% for every 1 m/s increase in PWV. Similarly, the risk of a major CV event increases by 31.8% for every 10% increase in AIx³⁸.

Furthermore, through a mediation analysis, we decomposed the total effect of age on PWV into a direct effect of age and into an indirect effect through other variables previously associated with PWV. We showed that 28% of the total age effect on PWV is driven by SBP (21%) and BMI (7%), while the remaining 72% of the total effect can be attributed exclusively to age. The cumulative mediating effect of these variables is only partial, as the total effect of age on PWV is reduced but remained significant. It is plausible that the negative effect of age on PWV is mediated by increased SBP and BMI as these variables have been shown to independently affect PWV.

As seen in this study, age, SBP, and BMI have been previously identified as independent predictors of arterial stiffness in RA patients^{21,23,24,39}. However, the effect of age on PWV, mediated by SBP and BMI, has not been previously described. On the other hand, distensibility is not as well-studied as a marker of arterial stiffness in RA patients^{25,26}, and the association between BMI and sex observed in our study has not been previously published.

Treatment with NSAIDs or corticoids to which our patients are subjected, may affect the associations found in our study. In fact, it has been previously described that NSAIDs and corticosteroids are associated with arterial stiffness^{40–42}. In any case, in our study, when “NSAIDs treatment” or “corticoids treatment” variables were introduced into the models, there was no significant association with PWV, AIx, or distensibility. Even so, the fact that corticosteroids promote endothelial dysfunction and increase the production of reactive oxygen species⁴² does not rule out corticosteroids as possible negative effectors of arterial stiffness. Studies designed with this objective would be necessary to better evaluate the effect of these treatments on arterial stiffness.

Additionally, we observed no significant association between inflammatory variables (CRP, ESR, and fibrinogen), disease activity or disease duration and arterial stiffness (PWV, AIx, and distensibility). This is in agreement with previous studies^{19,23,31,43–45} but in contrast with others^{11,14,16,17,20–22}. These discrepancies might be attributed to the different levels of inflammatory biomarkers profiled and to the relatively short mean disease duration of nine years within our cohort.

High cholesterol levels have been associated with reduced arterial elasticity^{22,39}, but in our study as in others¹⁹, no association was found with lipid profiles. Therefore, static measurements of classical lipid values might not be sufficient to generate clinically useful information until more advanced measures are utilized (i.e., sizes and concentrations of lipid subfractions, compositional changes, and functionality).

In a previous study with this population³⁹, we showed that age was associated with cIMT and plaque presence. In the same way, age has been the variable more associated with arterial stiffness in the present study showing the importance of this variable in the development of atherosclerotic process. On the other hand, in our previous study, we also observed an age-gender interaction effect on cIMT, which has not been observed in the present study on arterial stiffness. Furthermore, in the previous report, DAS28 was associated with an increase in cIMT in women but in the present study, we did not find any association of arterial stiffness with RA disease severity. These differences show that although cIMT and PWV are markers of early arterial wall alteration, the remodeling process of the arterial wall is still incompletely understood in RA patients. Furthermore, PWV and AIx have been independently associated with cIMT and plaque presence in RA patients³¹, an observation that has not been detected in the present study. Moreover, other studies failed to find this association, and the question of whether arterial stiffness augments cardiovascular risk by increasing atherosclerosis remains unclear^{6,32}.

Our study has some limitations: its cross-sectional nature do not allow us to draw any conclusion about the causal relation between PWV, distensibility, and AIx and atherosclerosis. Furthermore, the selection of our RA patients are regional focus, so the results might be too population-specific and difficult to generalize across other populations. Thus, larger series with measures of atherosclerosis and with follow-up would be needed to confirm a clinical relevance of an increase in PWV and AIx regarding CV risk in our RA patients.

In conclusion, the results of this study demonstrate that in patients with RA, age is the most important variable for determining the increase in PWV. We also found that a significant proportion of the negative effect of age on PWV occurs through an increase in SBP and BMI. Finally, we found no association between lipid or inflammation variables with an increase in arterial stiffness.

Data Availability

The datasets generated during the analysis of the current study are available from the corresponding author on request.

References

- Gabriel, S. E. *et al.* Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* **48**, 54–8 (2003).
- Castañeda, S. *et al.* Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Semin. Arthritis Rheum.* **44**, 618–26 (2015).
- Salmon, J. E. & Roman, M. J. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* **121**, S3–8 (2008).
- Del Rincón, I. D., Williams, K., Stern, M. P., Freeman, G. L. & Escalante, A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* **44**, 2737–45 (2001).
- Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Juanatey, C. & Martin, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin. Arthritis Rheum.* **35**, 8–17 (2005).
- Cecelja, M. & Chowienczyk, P. Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **1**, 1–10 (2012).
- Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur. Heart J.* **31**, 2338–50 (2010).
- Flore, R. *et al.* New modalities of ultrasound-based intima-media thickness, arterial stiffness and non-coronary vascular calcifications detection to assess cardiovascular risk. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **19**, 1430–41 (2015).
- Kawasaki, T., Sasayama, S., Yagi, S., Asakawa, T. & Hirai, T. Non-invasive assessment of the age related changes in stiffness of major branches of the human arteries. *Cardiovasc. Res.* **21**, 678–87 (1987).
- Vlachopoulos, C. *et al.* The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation. *Atherosclerosis* **241**, 507–532 (2015).
- Ambrosino, P. *et al.* Non-invasive assessment of arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis of literature studies. *Ann. Med.* **47**, 457–467 (2015).

12. Arosio, E. *et al.* Forearm haemodynamics, arterial stiffness and microcirculatory reactivity in rheumatoid arthritis. *J. Hypertens.* **25**, 1273–8 (2007).
13. Avalos, I. *et al.* Increased augmentation index in rheumatoid arthritis and its relationship to coronary artery atherosclerosis. *J. Rheumatol.* **34**, 2388–94 (2007).
14. Del Rincón, I., O'Leary, D. H., Freeman, G. L. & Escalante, A. Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* **195**, 354–60 (2007).
15. Roman, M. J. & Salmon, J. E. Cardiovascular Manifestations of Rheumatologic Diseases. *Circulation* **116**, 2346–2355 (2007).
16. Provan, S. A. *et al.* Early prediction of increased arterial stiffness in patients with chronic inflammation: a 15-year followup study of 108 patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **38**, 606–12 (2011).
17. Mäki-Petäjä, K. M. *et al.* Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor- α therapy. *Circulation* **114**, 1185–92 (2006).
18. Roman, M. J. Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **46**, 194–9 (2005).
19. Wong, M. *et al.* Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum.* **48**, 81–9 (2003).
20. Wällberg-Jonsson, S., Johansson, H., Ohman, M. L. & Rantapää-Dahlqvist, S. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. *J. Rheumatol.* **26**, 2562–71 (1999).
21. Kocabay, G., Hasdemir, H. & Yildiz, M. Evaluation of pulse wave velocity in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Behçet's disease. *J. Cardiol.* **59**, 72–7 (2012).
22. Botta, E. *et al.* Associations between disease activity, markers of HDL functionality and arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* **251**, 438–44 (2016).
23. Şirin Özcan, A. N., Aslan, A. N., Ünal, Ö., Ercan, K. & Küçükşahin, O. A novel ultrasound-based technique to establish a correlation between disease activity and local carotid stiffness parameters in rheumatoid arthritis. *Med. Ultrason.* **19**, 288 (2017).
24. Aslan, A. N., Şirin Özcan, A. N., Erten, Ş., Alsancaç, Y. & Durmaz, T. Assessment of local carotid stiffness in seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Scand. Cardiovasc. J.* **51**, 255–260 (2017).
25. Karp, G. *et al.* Assessment of aortic stiffness among patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis by magnetic resonance imaging. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **32**, 935–944 (2016).
26. Erhayiem, B. *et al.* Coronary Artery Disease Evaluation in Rheumatoid Arthritis (CADERA): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **15**, 436 (2014).
27. Cypiene, A. *et al.* Non-invasive assessment of arterial stiffness indices by applanation tonometry and pulse wave analysis in patients with rheumatoid arthritis treated with TNF- α blocker remicade (infliximab). *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **50**, 119–22 (2007).
28. Ambrosino, P. *et al.* Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemostasis* **113**(5), 916–30 (2015).
29. İkdahl, E. *et al.* Predictive Value of Arterial Stiffness and Subclinical Carotid Atherosclerosis for Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* **43**(9), 1622–30 (2016).
30. Taverner, D. *et al.* Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age. *PLoS One* **13**, e0193690 (2018).
31. Pieringer, H., Schumacher, S., Stuby, U. & Biesenbach, G. Augmentation Index and Large-Artery Remodeling in Patients with Longstanding Rheumatoid Arthritis Compared with Healthy Controls. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 163–169 (2009).
32. Robustillo-Villarino, M. *et al.* Pulse wave velocity and augmentation index are not independently associated with carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **36**, 2601–2606 (2017).
33. Van Bortel, L. M. *et al.* Non-invasive assessment of local arterial pulse pressure: comparison of applanation tonometry and echo-tracking. *J. Hypertens.* **19**, 1037–1044 (2001).
34. Bramwell, J. C. & Hill, A. V. The velocity of the pulse wave in man. *Proc R Soc Lond B.* **93**, 298–306 (1992).
35. Engelen, L. *et al.* Reference Values for Arterial Measurements Collaboration. Reference values for local arterial stiffness. Part A: carotid artery. *J. Hypertens.* **33**, 1981–1996 (2015).
36. Bossuyt, J. *et al.* Reference Values for Arterial Measurements Collaboration. Reference values for local arterial stiffness. Part B: femoral artery. *J. Hypertens.* **33**, 1997–2009 (2015).
37. Hayes, A. F. Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis. A Regression-Based Approach. (The Guilford Press, 2017).
38. Vlachopoulos, C. *et al.* Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Heart J.* **31**, 1865–1871 (2010).
39. Kim, Y.-S. *et al.* The major determinants of arterial stiffness in Korean patients with rheumatoid arthritis are age and systolic blood pressure, not disease-related factors. *Rheumatol. Int.* **32**, 3455–3461 (2012).
40. Petersons, C. J. *et al.* Low dose prednisolone and insulin sensitivity differentially affect arterial stiffness and endothelial function: An open interventional and cross-sectional study. *Atherosclerosis* **258**, 34–39 (2017).
41. Claridge, M. *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drugs are associated with increased aortic stiffness. *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 149–53 (2005).
42. Anyfanti, P. *et al.* Association of non-invasive hemodynamics with arterial stiffness in rheumatoid arthritis. *Scand. Cardiovasc. J.* **52**, 171–176 (2018).
43. Klocke, R., Cockcroft, J. R., Taylor, G. J., Hall, I. R. & Blake, D. R. Arterial stiffness and central blood pressure, as determined by pulse wave analysis, in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 414–8 (2003).
44. Turesson, C. *et al.* Increased stiffness of the abdominal aorta in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 896–901 (2005).
45. Dzieża-Grudnik, A. *et al.* Arterial stiffness is not increased in patients with short duration rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Blood Press.* 1–7, <https://doi.org/10.1080/08037051.2016.1232586> (2016).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI030786), Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBER-DEM), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and Sociedad Española de Reumatología. The funders has no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

J.C.V., L.M. and A.C. conceived the hypothesis and designed the objectives of the study D.T., A.C. and S.P. selected the patients and created the data-base R.F. performed the ultrasound evaluation of intima-media thickness and arterial stiffness J.C.V. and D.T. analysed the data J.C.V., D.T. and L.M. wrote the main manuscript All authors reviewed the manuscript and contributed to the final version.

OBJETIVO 2. Descubrir un perfil plasmático de microRNAs común en pacientes con AR sin ECV preclínica y en pacientes con cardiopatía isquémica sin AR y diferente al de controles sanos que identifique a los pacientes con AR en riesgo de desarrollar ECV.

3.3 MicroRNA DIFFERENTIAL EXPRESSION SHARED BETWEEN RHEUMATOID ARTHRITIS AND ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION: AN EXPLORATORY STUDY.

Clinical and Experimental Rheumatology 2019;37(5):886

Letters to the Editors

MicroRNA differential expression shared between rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction: an exploratory study

Sirs,

Accumulating evidence indicates that a major cause of death among rheumatoid arthritis (RA) patients is cardiovascular disease (CVD). In fact, the risk of CVD is 1.5 times higher in RA compared with the general population (1). MicroRNAs (miRs) are small, non-coding RNA molecules of 21-24 base pairs that can control the expression of multiple gene posttranscriptional level. Abnormal expression of miRs in patients with RA are well documented. Some miRs have been associated with clinical variables of RA (tender joint and disease activity score-

erythrocyte sedimentation rate) (DAS28-ESR) and with a higher risk and progression to RA (2, 3). Furthermore, reports indicate that some specific miRs might be helpful in the early detection of acute myocardial infarction (AMI) and differential expression of miRs has been identified in patients with coronary artery disease and atherosclerosis (4, 5). However, the association of those miRs with cardiovascular disease in patients with RA remains unclear. The aim of the study was to identify plasma miRs in RA patients that can facilitate earlier diagnosis of CVD and provide insight regarding the increase risk for CVD in these patients. We compared the plasmatic profiles of miRs (miRNome) in RA patients without CVD, in patients with early AMI but without RA, and in healthy controls, with the objective to find miRs commonly expressed in the

two groups of patients but at different levels from the controls. RA patients were selected according to the criteria established by the American College of Rheumatology of 1987 and early AMI was defined as having an acute myocardial infarction before the age of 55. We recruited male subjects who were matched for age and for classical cardiovascular risk factors.

In accordance with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration, the subjects were informed of the research nature of the study and gave written consent prior to participation. The study was approved by the clinical research Ethics Committee of the University Hospital Sant Joan.

miRNome was analysed by real time PCR using validated TaqMan® OpenArray® MicroRNA panels which enables the quantification of 754 human miRNAs. Quantitative

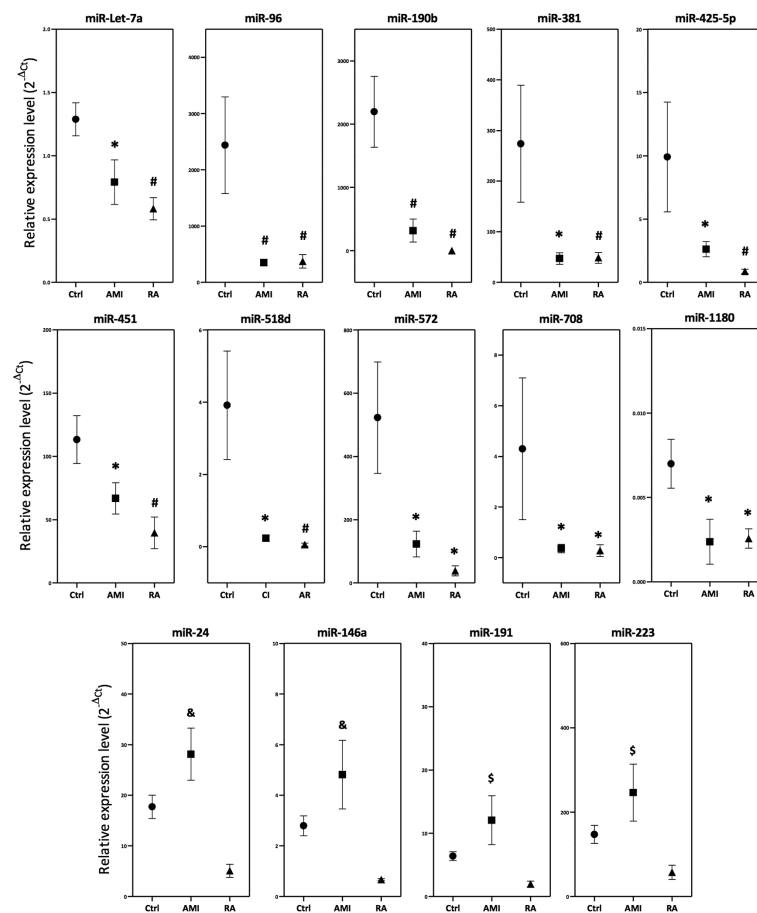


Fig. 1. Differential expression of miRs significantly down-regulated in rheumatoid arthritis patients (RA) and in patients with cardiovascular disease (AMI) compared with healthy controls (Ctrl). **p* < 0.05 vs. controls, ***p* < 0.01 vs. controls, #*p* < 0.05 vs. RA, and \$*p* < 0.01 vs. RA.

Letters to the Editors

changes in expression levels between groups (differential expression) were analysed with Expression Suite software. Selected miRs were further analysed with 2^{-DCt} method. Kruskal-Wallis test and Dunns post-test were used for the statistical analyses. Carotid intima-media thickness (cIMT) was also measured using a My Lab 50 X-Vision sonograph (Esaote SpA, Barcelona, Spain) with a linear array ultrasound probe small parts broadband transducer (5-12MHz). Statistical analyses were performed using SPSS software, v. 23. Continuous variables are presented as the mean (standard deviation). The expression levels of 754 miRs were studied in 7 RA patients, 7 AMI patients and 7 healthy controls. The mean age of the population studied was 46.01(1.63), the body mass index was 26(2.7) and none of them were smokers, nor suffering from diabetes, hypertension or dyslipidaemia. In RA patients 71% and 57% were positive for anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) and rheumatoid factor antibodies (RF), respectively. The mean disease duration was 8.4 (8.0) years. We did not find any differences in cIMT between RA patients and controls. As for miRNome analysis, we detected 50% (379) of the miRs represented in the array in plasma of the three groups of patients. Circulating miRNome in RA and AMI patients were different from the controls. Plasma miRs that were expressed at the same level in RA and AMI patients but expressed significantly different compared with controls were: miRlet-7a, miR96, miR381, miR451, miR518d, miR425-5p, miR572, miR190b, miR708 and miR1180 (Fig. 1). Interestingly, all 10 miRs were down-regulated compared with controls. Moreover, 9 miRs were differentially expressed in AMI patients and 16 miRs in RA patients compared with controls. We observed carotid plaques in three of RA patients but we did not observe

plaques in any of the controls. Interestingly, compared with RA patients without plaque, the RA patients with plaque have 23.6%, 34.8%, 25.7%, 4.7% and 0.6% less expression of miRlet-7a, miR96, miR381, miR451, miR425-5p, respectively. In RA patients, two of these miRs were significantly associated with inflammatory parameters. Specifically, the miR425-5p with C-reactive protein and miR381 with fibrinogen ($p<0.046$ and $p<0.042$, respectively). Furthermore, the figure also shows that miR24, miR146a, miR191, and miR223, which had been previously associated with CVD (6, 7) were upregulated in AMI patients but not in RA and controls, suggesting an association with elevated risk of CVD independently of inflammation.

Overall, we have identified 10 miRs sharing a similar expression pattern in RA patients and in individuals with early AMI, suggesting that these miRs could be epigenetic biomarkers of increased CVD in RA patients. A bigger clinical study is necessary to validate the role of these miRs.

Acknowledgements

The authors thank the patients and the controls for their participation in the study.

S. PAREDES¹
D. TAVERNER¹
R. FERRE^{2,4}
J.M. ALEGRET³
L. MASANA^{2,4}
J.-C. VALLVÉ⁵

¹Sección de Reumatología, ²Servicio de Medicina Interna, ³Sección de Cardiología, Hospital Universitario Sant Joan, Universidad Rovira i Virgili, Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus (Tarragona), Spain; ⁴Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Universidad Rovira i Virgili, IISPV, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Reus (Tarragona) Spain.

Please address correspondence to:

Joan-Carles Vallvé, PhD,
Facultat de Medicina,
Universitat Rovira i Virgili,
Sant Llorenç 21,
43201 Reus, Catalonia, Spain.
E-mail: jc.vallve@urv.cat

Funding: this work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, [FIS PI030786]; Centro de Investigación Biomédica de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM); Fundación Española de Reumatología; and Sociedad Española de Reumatología

Competing interests: none declared.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2019.

References

1. MACKAY RH, KULLER LH, ORELAND LW: Update on cardiovascular disease risk in patients with rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2018; 44: 475-87.
2. OUBOUSSAD L, HUNT L, HENSOR EMA *et al.*: Profiling microRNAs in individuals at risk of progression to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 288.
3. CHUROV AV1, OLEINIK EK, KNIP M: MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 1029-37.
4. JONES BUIE JN, GOODWIN AJ, COOK JA *et al.*: The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. *Atherosclerosis* 2016; 254: 271-81.
5. BORGHINI A, ANDREASSI MG: Genetic polymorphisms offer insight into the causal role of microRNA in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2018; 269: 63-70.
6. GUARDIOLA M, VALLVÉ JC, ZAINA S, RIBALTA J: Epigenetics in atherosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 2016; 28: 102-19.
7. ANDREOU I, SUN X, STONE PH *et al.*: miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol Med* 2015; 21: 307-18.

OBJETIVO 3. Validar en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide los microRNA plasmáticos identificados.

3.4 PLASMA CIRCULATING MIR-425-5P AND MIR-451A AS BIOMARKERS OF CARDIOVASCULAR DISEASE IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS: ASSOCIATION WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS, ARTERIAL STIFFNESS AND INFLAMMATORY PARAMETERS.

(Submitted to Rheumatology)

**Plasma expression of microRNA-425-5p and microRNA-451a as
biomarkers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients**

Delia Taverner¹, Joan-Carles Vallvé^{2,3,4} *, Roser Rosales^{2,4}, Raimon Ferré^{2,3,4,5}, Luis
Masana^{2,3,4,5} Silvia Paredes^{1,2}

1- Sección de Reumatología, Hospital Universitario Sant Joan, Reus, Catalonia, Spain

2- Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Universidad Rovira i Virgili, Reus,
Catalonia, Spain.

3- Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Catalonia, Spain

4- CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Madrid, Spain.

5- Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Sant Joan, Reus, Catalonia, Spain

* Corresponding author: Joan-Carles Vallvé, PhD, Facultat de Medicina, Universitat

Rovira i Virgili. Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain. (jc.vallve@urv.cat) Telf:

+34977759367

ABSTRACT:

Objective: To validate in patients with rheumatoid arthritis (RA) six plasmatic microRNAs (miRs) previously identified in a discovery study that can facilitate earlier diagnosis of cardiovascular disease (CVD) and provide insight regarding the increased risk for CVD observed in RA patients. **Methods:** miRs were quantified in independent samples from 214 RA patients, and their levels of expression in plasma were associated with subclinical atherosclerosis ((carotid intima-media thickness (cIMT)) and arterial stiffness ((pulse wave velocity (PWV) and distensibility)). **Results:** Adjusted multivariate analyses showed that expression levels of miR-425-5p in men and miR-451 in women were independent predictors of cIMT. Specifically, decreased expression of miR-425-5p was significantly associated with increased cIMT in men ($\beta=0.072$; $p=0.017$), whereas decreased expression of miR-451 was significantly associated with decreased cIMT in women ($\beta=-0.05$; $p=0.013$). Additionally, decreased expression of miR-451 was significantly associated with decreased PWV ($\beta=-0.72$; $p=0.035$) in the overall RA population. Distensibility showed no significant association. Among the variables significantly correlated with the expression levels of miR-425-5p and miR-451, ESR ($r = -0.136$, $p = 0.048$) was negatively correlated with miR-425-5p, and DAS28 ($r = 0.19$; $p = 0.006$), ESR ($r = 0.23$ $p = 0.001$), PCR ($r = 0.15$, $p = 0.033$) and fibrinogen ($r = 0.28$, $p = 0.0001$) were positively correlated with miR-451. **Conclusion:** Together, these findings provide the first evidence of a possible role of miR-425-5p and miR-451 as useful epigenetic biomarkers to assess CV disease in patients with RA.

KEYWORDS: rheumatoid arthritis, cardiovascular risk, microRNAs, carotid intima-media thickness, pulse wave velocity

INTRODUCTION

Patients with rheumatoid arthritis (RA) present an increased risk of cardiovascular (CV) disease, estimated to be approximately 50% greater when compared to the general population. This risk is in part due to the inflammatory activity of RA, which plays an important role in the development of atherosclerosis (1,2). CV disease represents the major cause of morbi-mortality in RA patients, and acute myocardial infarction (AMI) is the most prevalent in those patients (2). In RA patients, subclinical atherosclerosis (determined by ultrasound carotid intima-media thickness (cIMT) and the presence of carotid plaques) as well as arterial stiffness (measured by pulse wave velocity (PWV) and distensibility) have been accepted as surrogate markers of CV disease with good prediction of CV events (3,4).

MicroRNAs (miRs) are a family of small, non-coding RNA molecules of approximately 21-25 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level (5). miRs possess excellent stability in plasma, and circulating miRs have great potential as disease biomarkers. They have been implicated in many biological processes, including autoimmune diseases, as they are able to modulate adaptive responses and the differentiation of B and T cells (6).

Furthermore, abnormal expression of circulating miRs in patients with RA is well documented. Some miRs have been associated with a higher risk and progression to RA (7) as well as with clinical variables of RA [tender joint and disease activity score-erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR)] (8,9). In addition, miRs are recognized as critical regulators in atherosclerosis (10), some specific miRs are useful for the early detection of AMI, and differential expression of miRs has been identified in patients with coronary artery disease and atherosclerosis (11–14). However, the association of

miRs with cardiovascular disease in patients with RA remains unclear (15). In a discovery study carried out in male subjects, we found a panel of 10 plasma miRs that were downregulated in RA patients and in individuals with early AMI compared with controls, suggesting that these miRs are epigenetic biomarkers of increased CV disease in RA patients (16).

The objective of the present study was to validate whether those miRs are associated with surrogate markers of CV disease and so can facilitate an early diagnosis of CV disease in RA patients.

PATIENTS AND METHODS

PATIENTS: The RA population of the present study has been described in a previous paper (17). Briefly, the 1987 American College of Rheumatology criteria for RA diagnosis were used to select patients who attended the University Hospital Sant Joan de Reus via external consultation. 214 patients between 20 and 80 years of age were included in the study and on the same day of the medical visit, we performed blood collection and carotid ultrasound. Clinical evaluation of the patients has been previously described ((17) and supplementary material). As a measure of disease activity, the disease activity score (DAS28) was calculated according to the ESR. Determination of swollen and tender joint counts were also obtained (TJC, SJC respectively). Pain was measured using the 0-10 visual analogue scale, and patients reported any disability with the health assessment questionnaire (HAQ) index. The DAS28 variable was categorized as remission ($DAS28 < 2.6$), low activity ($2.6 \leq DAS28 < 3.2$), moderate activity ($3.2 \leq DAS28 \leq 5$) and high activity ($DAS28 > 5.1$). The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of our hospital (11-04-28/4proj5), and informed consent was obtained from

each patient. We executed the investigation in accordance with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration. Patients and public were not involved in the development of the study.

LABORATORY MEASUREMENTS: Blood samples were collected from 214 patients, who had fasted for at least 12 hours. Plasma was obtained by whole blood centrifugation at 3.000 rpm for 10 minutes and plasma samples were stored at -80°C for analysis. Analytical determinations were performed by enzymatic and conventional methods (Supplementary material). RF positive (RF+) was defined for RF values > 20 and positive ACPA (ACPA+) for ACPA values > 1 . Dyslipemia was defined as having HDLc $< 50\text{mg/dL}$ for women or $< 40\text{ mg/dL}$ for men, or TG $> 150\text{ mg/dL}$, or LDLc $> 100\text{ mg/dL}$ or in treatment with statins or other hypocholesterolemic drugs.

ULTRASOUND EVALUATION OF INTIMA-MEDIA THICKNESS AND ARTERIAL STIFFNESS

To measure carotid intima media thickness (cIMT), we used a My Lab 50 X-Vision sonographer (Esaote SpA, Genova, Italy). In vivo measurements of cIMT were performed at the predefined points using the QIMT[®] radiofrequency image processing software (Esaote SpA, Genova, Italy). We defined plaque as a focal structure encroaching into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding IMT value, or a thickness $>1.5\text{ mm}$.

Arterial stiffness expressed by the PWV and carotid distensibility was measured directly at both common carotid arteries using the ultrasound linear probe (5-12 MHz) as a tonometer. It was analysed in vivo by the Quality Arterial Stiffness (QAS[®]) radiofrequency software (Esaote SpA, Genova, Italy). Carotid distensibility was the change in diameter of the carotid artery secondary to intravascular volume expansion

caused by the left ventricle systole. Detailed evaluation is described as supplementary material.

PLASMA microRNA EXPRESSION

In a previous discovery study (16), we found 10 miRs that were downregulated in RA patients and were candidates for the present study. Of these 10 miRs, six (miR Let-7a, miR-96, miR-381, miR-425-5p, miR-451, and miR-572) were included for validation in the present study and four miRs were discarded due to very low-level expression. Selected miRs were validated in independent plasma samples from 214 RA patients (validation cohort).

Before RNA extraction, an aliquote of 200 microliters was used for hemolysis evaluation. Hemolysis was discarded after spectrophotometer analysis at $\lambda=414\text{nm}$, corresponding to oxy-hemoglobin contamination.

The extraction of RNA containing the fraction of small RNAs was carried out from 200 microliters of frozen plasma by means of the commercial miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon) and following the manufacturer's instructions. Before the extraction, 1 μL of a mixture of synthetic RNAs (UniSp2, UniSp4, and UniSp5) (Exiqon) were spike in the plasma in order to control for the efficiency of the RNA extraction. In addition, 1.25 μL of MS2 RNA carrier (Roche) was added to improve RNA extraction.

Reverse transcription (RT) was carried out using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon, Denmark), and following the manufacturer's instructions. The efficiency of the RT reactions were controlled by adding 0.5 μL of cel-miR-39-3p and UniSp6 (Exiqon).

Selected miRNAs candidates were validated by qPCR using commercial miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, ExiLENT SYBR Green master mix Kit (Exiqon, Denmark),

commercial primers for each miR (hsa-miR LNA™ PCR primer set, UniRT) and in accordance with the manufacturer's protocols. Melting curve analysis were performed to control the specificity of the qPCR. RNA extraction, RT and qPCR reaction conditions are described as supplementary material. The cycle threshold (Ct) for each sample and each miR was obtained with SDS v2.3 software (Applied Biosystems). miR-16-5p was choose as reference for normalization as showed an optimal stability after evaluation with RefFinder (18). The relative expression of each miR in each sample was calculated using the variable ΔCt , obtained as Ct miR candidate - Ct miR-16-5p. An increase in the ΔCt variable of a particular miR represented a decrease in the expression of that miR.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical software SPSS, version 23 was use to analysed all data. Continuous variables are presented as the mean (standard deviation), and categorical variables are presented as the percentage (number of individuals). ANOVA was used to evaluate differences between groups followed by Bonferroni correction as a post hoc test. For categorical variables, the differences between the proportions were analysed using the chi-Squared test. Bivariate correlations were estimated using the Pearson correlation coefficient "r". To evaluate miR associations with dependent variables (cIMT, PWV, and distensibility), multiple linear regression was used with multivariate models. Because in a previous study to estimate the cIMT variable, we reported a significant interaction between age and sex (17), in the present study, multivariable models for cIMT associations had to be performed with the population stratified into men and women. The R-squared (R^2) statistic was used to provide an estimate of the percentage of the response variable variability that was explained by a linear model. Multivariate logistic regression was used to estimate the presence of carotid plaques. In multivariable regression analysis,

we initially selected clinically relevant variables and known confounders for inclusion in the models. Furthermore, the iterative process of variable selection was performed using stepwise linear and logistic regression analyses. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

We included 214 patients with RA in the study. General characteristics of the cohort are shown in table 1 and in previous publications (17,19). Briefly, the mean age and disease duration were 58 (12) and 9.4 (9.1) years, respectively. Female patients represented 64.5% of the cohort; 60% of patients were hypertensive, 11.7% were diabetic, 41% were dyslipidaemic, and 26% were smokers. The percentages of patients in remission or with low, moderate or high disease activity were 27, 19, 44, and 10, respectively. There were differences between men and women in some of these parameters (table 1 and previous publication (17)). Disease-modifying antirheumatic drugs were administered to 95% of the patients, which included 75% receiving non-biological drugs and 20% biological drugs. Fifty-seven percent of patients received non-steroidal anti-inflammatory drugs, and/or 51% received corticosteroids.

We first evaluated the correlations of the candidate miRs (16) with cIMT stratified by sex according to the previous interaction that we observed between age and sex (17) (see Methods). Univariate analyses showed that only miR-451 was significantly associated with cIMT in women (Table 2). No miRs were associated with cIMT in men. However, when adjusted for age (Table 3), we observed that the levels of miR-425-5p in men and miR-451 in women were associated with cIMT. Furthermore, after adjusting for traditional confounders and treatments (Figure 1), multivariable linear regression analyses showed that the expression levels of both miRs were independent predictors

of cIMT. Specifically, decreased expression of miR-425-5p was significantly associated with increased cIMT in men ($\beta=0.072$; $p=0.017$) (Figure 1A), and miR-425-5p expression level contributed a significant 6% (R^2 change in figure 2) to the explanation of cIMT variability, with the overall model explaining 61% (R^2 in figure 2) of the cIMT variability in men. Decreased expression of miR-451 was significantly associated with decreased cIMT in women ($\beta=-0.05$; $p=0.013$) (Figure 1B), and miR-451 expression level provided a significant extra 3.5% (R^2 change in Figure 2) of the explanation of cIMT variability, with the overall model explaining 38% (R^2 in Figure 2) of the cIMT variability in women. The cIMT predicted with the two models (for men and women) had a highly significant correlation with the cIMT observed ($r=0.78$; $p=0.005$ for men and $r=0.62$; $p=0.011$ for women) (supplemental Figure 1). The expression of the other miRs selected (miR-Let7a, miR-96, miR-381, and miR-572) was not associated with cIMT in men or women (Figure 1A, 1B). As for carotid plaque presence (cPP), none of the miRs studied contributed significantly to the explanation of the variability of cPP (supplemental Table 1). The lack of association was observed both in the entire population and in the sex-stratified populations.

Regarding stiffness markers, univariate analysis in the overall population did not show an association of any candidate miR with PWV. However, when adjusting for traditional confounders and treatments, we observed that decreased expression of miR-451 was significantly associated with decreased PWV ($\beta=-0.72$; $p=0.035$) (Figure 3A). Although the effect size was small (R^2 change = 1.6%), miR-451 expression level significantly contributed to the explanation of PWV variability, with the overall model explaining 36% of that variability. The expression of miR-425-5p, miR-Let7a, miR-96, miR-381, or miR-

572 was not associated with PWV. None of the candidate miRs showed a significant association with distensibility (Figure 3B).

Next, we evaluated which variables were significantly associated with the expression levels of miR-425-5p and miR-451. We tested, in the overall population, disease-related variables and variables characteristics of the population studied. We observed that the expression of miR-425-5p was negatively correlated with ESR ($r=-0.136$; $p=0.048$) and that the expression of miR-451 was positively correlated with DAS28 ($r=0.19$; $p=0.006$), ESR ($r=0.23$; $p=0.001$), CRP ($r=0.15$; $p=0.033$), and fibrinogen ($r=0.28$; $p=0.0001$) (supplemental Table 2). Those correlations were basically maintained in men, while in women, only fibrinogen was correlated with the expression of miR-451 ($r=0.175$; $p=0.041$) (supplemental Table 3).

DISCUSSION

In the present study, we have shown that miR-425-5p and miR-451 are associated, differentially between men and women with RA, with surrogate markers of CV disease such as cIMT and arterial stiffness. Specifically, we observed that in men, a decrease in the plasma expression levels of miR-425-5p was associated with a significant increase in cIMT. The present study is the validation of a previous discovery study in which we evaluated the plasma expression profile of 754 miRs in 7 male patients with RA, in whom 10 miRs were expressed at levels similar to those of 7 male patients with AMI and were downregulated compared their levels with 7 male controls (16). In the present study carried out in a validation cohort of 214 patients, we validated miR-425-5p, suggesting that reduced expression levels of this miR could indicate a higher CV risk in patients with RA. In addition, the specificity of action of the miRs has allowed us to identify miR-451 as a protective marker against cardiovascular risk in RA patients. We

determined that decreases in the expression of miR-451 were significantly associated, in women, with lower values of cIMT and, in the entire RA population, with significant decreases in arterial stiffness measured by the PWV.

Many studies have shown that both cIMT and PWV are important and sensitive surrogate markers of cardiovascular disease (CVD). Different publications have shown an increase in cIMT in RA patients compared with controls (20–23). In addition, cIMT is able to prospectively predict clinical CVD events independently of traditional risk factors in CVD and RA patients (24,25). In particular, carotid IMT > 0.9 has a high predictive power for the development of CV events over a 5-year follow-up period (21,26).

Furthermore, PWV, a biomarker of arterial stiffness that reflects early effects on the arterial wall, has been reported to be consistently increased in RA patients (27,28) and has been shown to independently predict CV events and mortality (27,29).

There is important evidence in the literature showing that different miRs play pivotal roles in the pathophysiology of RA and CVD (16). However, there are no data describing miRs significantly associated with CV risk in RA patients. Few studies have pointed out the importance of dysregulation of miR expression as directly involved in the pathogenesis of CVD in patients with RA but without significant results (15,30). miR-425-5p is mainly associated with neoplastic pathology, and the results of our study are the first to associate low expression of this miR with the development of subclinical arteriosclerosis in patients with RA. Furthermore, significantly low levels of miR-425-5p have also been recently described in RA patients compared with controls (31).

Moreover, miR-425-5p has been shown to function as a negative regulator of cardiac fibrosis, and its plasma level has been proposed as a biomarker to predict cardiac fibrosis and heart failure (32). By contrast, miR-451 has been widely studied in

association with RA pathogenesis in RA patients and with atherosclerosis in CVD patients. Our study is the first to associate low expression of this miR with less CV atherosclerosis and arterial stiffness in RA patients. Dysregulation of miR-451 expression has been described in CVD patients. Indeed, miR-451 is highly expressed during myocardial infarction (33) and played a critical role in cardiac hypertrophy (34). In addition, data have shown overexpression of miR-451 in patients with coronary artery disease (35,36), which may modulate the production of pro-inflammatory cytokines. Treatment with statins could decrease the level of this miRNA, making it a potential new biomarker that assesses the efficacy of statins in patients with unstable angina (37).

Deregulation of miR-451 expression has also been involved in RA pathogenesis. Thus, miR-451 is upregulated in T cells of peripheral blood from RA patients (38), although downregulation in RA neutrophils has also been described (39). In addition, miR-451 inhibits the proliferation of synovial fibroblasts and the production of cytokines from patients with RA, so it may be considered a future therapy in RA (40). Furthermore, in experimental studies in rats, it has been postulated as a possible new biomarker of disease activity and response to treatment (41).

The differences observed in our study between men and women could have different explanations. The prevalence of traditional cardiovascular risk factors is different between men and women (42). Furthermore, disease activity may affect the burden of atherosclerosis (43) and it has been described that measures of disease activity seem to be worse in women than in men (44). In addition, sex hormones may also be the basis for the differences, as it has been shown that estrogens decrease the inflammatory

immune response (45) and hormone replacement therapy shows a beneficial effect on RA disease activity (46).

We also observed that plasma expression of miR-425-5p correlated negatively with ESR, while miR-451 correlated positively with DAS28, ESR, CRP and fibrinogen. These unexpected correlations probably indicate that the effects of miR-425-5p and miR-451 on cIMT and PWV observed in this study are not mediated through the classical inflammatory and RA disease activity parameters but through other mediators and are modulated by genetic factors. In addition, we have shown that in our RA population, cIMT was not associated with inflammatory or serological variables (17). Likewise, the association between miRs and inflammation or RA disease activity has been described in the literature, although not with conclusive results. Thus, of the multiple miRs associated with RA, few have shown a significant relationship with inflammation and disease activity. For instance, miR-146a, which has been described to be overexpressed in the peripheral blood of patients with RA, positively correlates with ESR, while other miRNAs, such as miR-16 (9) and miR-233, have been correlated to DAS28 and the latter also with CRP in patients with initial RA (47).

In the present study, the plasma levels of miR-425-5p and miR-451 did not explain the presence of arteriosclerotic plaque in our RA patients. We must consider that cIMT and the presence of arteriosclerotic plaques reflect different stages and features of the arteriosclerosis process (48,49). Thus, cIMT represents the thickening of the muscular layer of the arterial media layer, while plaque formation is the result of thickening of the arterial intima. In addition, the formation of arteriosclerotic plaques is considered a later stage in the arteriosclerotic process (50), so the expression levels of the miRs

identified in this study would be markers of earlier stages of the arteriosclerotic process, which is relevant to the objective of the present study.

In conclusion, the results of our study demonstrate that decreases in the expression of miR-425-5p in men and miR-451 in women are associated with higher and lower values of subclinical arteriosclerosis, respectively. Furthermore, decreases in the expression of miR-451 are associated with lower arterial stiffness in the overall RA population. This study provides the first evidence of a possible role of miR-425-5p and miR-451 as useful epigenetic biomarkers to assess CV risk in patients with RA.

REFERENCES

1. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2005 Aug;35(1):8–17.
2. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012 Sep;71(9):1524–9.
3. Tanasescu C, Jurcut C, Jurcut R, Gingham C. Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. *European journal of internal medicine*. 2009 Jul;20(4):348–54.
4. Cecelja M, Chowienczyk P. Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM cardiovascular disease*. 2012 Jul 31;1(4):1–10.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
6. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clinical Immunology*. 2010 Jul;136(1):1–15.
7. Tavasolian F, Abdollahi E, Rezaei R, Momtazi-Borojeni AA, Henrotin Y, Sahebkar A. Altered Expression of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis. *Journal of cellular biochemistry*. 2018 Jan;119(1):478–87.
8. Bae S-C, Lee YH. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *International journal of rheumatic diseases*. 2018 Jul;21(7):1335–42.
9. Feng Z, Li J, Ren J, Lv Z. [Expression of miR-146a and miR-16 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis and their correlation to the disease activity]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2011 Feb;31(2):320–3.
10. Kwekkeboom RFJ, Lei Z, Doevendans PA, Musters RJP, Sluijter JPG. Targeted delivery of miRNA therapeutics for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2014 Sep 1;127(6):351–65.
11. Islas J, Moreno-Cuevas J. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Jul 17;19(7):2075.
12. Sun L-L, Li W-D, Lei F-R, Li X-Q. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018 Oct;22(10):4568–87.
13. Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS letters*. 2018 Sep;592(17):2884–900.
14. Schulte C, Zeller T. microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2015 Feb;5(1):17–36.
15. Ormseth MJ, Solus JF, Vickers KC, Oeser AM, Raggi P, Stein CM. Utility of Select Plasma MicroRNA for Disease and Cardiovascular Risk Assessment in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2015 Oct;42(10):1746–51.

16. Paredes S, Taverner D, Ferré R, Alegret J-M, Masana L, Vallvé J-C. MicroRNA differential expression shared between rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction: an exploratory study. *Clinical and experimental rheumatology*. 2019 Jun 3;
17. Taverner D, Vallvé J-C, Ferré R, Paredes S, Masana L, Castro A. Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age. Kuwana M, editor. *PLOS ONE*. 2018 Mar 1;13(3):e0193690.
18. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*. 2012 Jan 31;80(1):75–84.
19. Taverner D, Paredes S, Ferré R, Masana L, Castro A, Vallvé J-C. Assessment of arterial stiffness variables in patients with rheumatoid arthritis: A mediation analysis. *Scientific Reports*. 2019 Dec 14;9(1):4543.
20. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MND. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thrombosis and haemostasis*. 2015 May;113(5):916–30.
21. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Carotid intima-media thickness predicts the development of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2009 Apr;38(5):366–71.
22. Carotti M, Salaffi F, Mangiacotti M, Cerioni A, Giuseppetti GM, Grassi W. [Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: the role of high-resolution B mode ultrasound in the measurement of the arterial intima-media thickness]. *Reumatismo*. Jan;59(1):38–49.
23. Mohan A, Sada S, Kumar BS, Sarma KVS, Devi BV, Rao PVLNS, et al. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis by utilizing carotid intima-media thickness as a surrogate marker. *The Indian journal of medical research*. 2014 Sep;140(3):379–86.
24. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):459–67.
25. Kitagawa K, Hougaku H, Yamagami H, Hashimoto H, Itoh T, Shimizu Y, et al. Carotid intima-media thickness and risk of cardiovascular events in high-risk patients. Results of the Osaka Follow-Up Study for Carotid Atherosclerosis 2 (OSACA2 Study). *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2007;24(1):35–42.
26. Evans MR, Escalante A, Battafarano DF, Freeman GL, O’Leary DH, del Rincón I. Carotid atherosclerosis predicts incident acute coronary syndromes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011 May;63(5):1211–20.
27. Ambrosino P, Tasso M, Lupoli R, Di Minno A, Baldassarre D, Tremoli E, et al. Non-invasive assessment of arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of literature studies. *Annals of medicine*. 2015 Aug 18;47(6):457–67.
28. Arosio E, De Marchi S, Rigoni A, Prior M, Delva P, Lechi A. Forearm haemodynamics, arterial stiffness and microcirculatory reactivity in rheumatoid arthritis. *Journal of hypertension*. 2007 Jun;25(6):1273–8.

29. Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, et al. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 Feb 25;63(7):636–46.
30. López-Pedreira C, Pérez-Sánchez C, Ramos-Casals M, Santos-Gonzalez M, Rodriguez-Ariza A, José Cuadrado M. Cardiovascular Risk in Systemic Autoimmune Diseases: Epigenetic Mechanisms of Immune Regulatory Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:1–10.
31. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, Oggiano A, Pasella S, Pinna S, et al. MicroRNA Expression Analysis of Centenarians and Rheumatoid Arthritis Patients Reveals a Common Expression Pattern. *International journal of medical sciences*. 2017;14(7):622–8.
32. Wang L, Liu J, Xu B, Liu Y-L, Liu Z. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2018 Nov;34(11):626–33.
33. Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Disease markers*. 2009;27(6):255–68.
34. Gan M, Zheng T, Shen L, Tan Y, Fan Y, Shuai S, et al. Genistein reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating miR-451/TIMP2. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019 Apr;112:108618.
35. Chen F, Zhao X, Peng J, Bo L, Fan B, Ma D. Integrated microRNA-mRNA analysis of coronary artery disease. *Molecular biology reports*. 2014 Aug 10;41(8):5505–11.
36. Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, et al. Signature of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers in Vulnerable Coronary Artery Disease. Beltrami AP, editor. *PLoS ONE*. 2013 Dec 5;8(12):e80738.
37. Zhang J, Ren J, Chen H, Han G. [Statins decreases expression of five inflammation-associated microRNAs in the plasma of patients with unstable angina]. *Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences*. 2015 Oct 18;47(5):761–8.
38. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, van der Lei RJ, Bijzet J, Kluiver J, et al. Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes & Immunity*. 2014 Mar 9;15(2):115–25.
39. Murata K, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, et al. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014 Mar;66(3):549–59.
40. Wang Z-C, Lu H, Zhou Q, Yu S-M, Mao Y-L, Zhang H-J, et al. MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(11):14562–7.
41. Dudics S, Venkatesha SH, Moudgil KD. The Micro-RNA Expression Profiles of Autoimmune Arthritis Reveal Novel Biomarkers of the Disease and Therapeutic Response. *International journal of molecular sciences*. 2018 Aug 5;19(8):2293.

42. Peters SAE, Muntner P, Woodward M. Sex Differences in the Prevalence of, and Trends in, Cardiovascular Risk Factors, Treatment, and Control in the United States, 2001 to 2016. *Circulation*. 2019 Feb 19;139(8):1025–35.
43. Targońska-Stępnia B, Biskup M, Biskup W, Majdan M. Gender Differences in Cardiovascular Risk Profile in Rheumatoid Arthritis Patients with Low Disease Activity. *BioMed Research International*. 2019 Mar 28;2019:1–7.
44. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy*. BioMed Central; 2009;11(1):R7.
45. Carlsten H. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunological Reviews*. 2005 Dec;208(1):194–206.
46. D’Elia HF, Larsen A, Mattsson L-A, Waltbrand E, Kvist G, Mellström D, et al. Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2003 Jul;30(7):1456–63.
47. Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014 Oct;73(10):1898–904.
48. Adams MR, Nakagomi A, Keech A, Robinson J, McCredie R, Bailey BP, et al. Carotid intima-media thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease. *Circulation*. 1995 Oct 15;92(8):2127–34.
49. Spence JD. Ultrasound measurement of carotid plaque as a surrogate outcome for coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 2002 Feb 21;89(4A):10B–15B; discussion 15B–16B.
50. Finn A V., Kolodgie FD, Virmani R. Correlation Between Carotid Intimal/Medial Thickness and Atherosclerosis: A Point of View From Pathology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010 Feb 1;30(2):177–81.

Figure and table legends

Table 1. General characteristics of RA patients overall and stratified by gender.

SBP=systolic blood pressure, DBP=diastolic blood pressure, HAQ=health assessment questionnaire index, ACPA=citrullinated anti-cyclic peptide antibodies, ESR=erythrocyte sedimentation rate, CRP=C-reactive protein, DAS28=disease activity score, DMARDs=disease-modifying antirheumatic drugs, NSAIDs=non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Table 2: Correlations of cIMT with miR expression levels stratified by sex. R = Pearson's coefficient, p = p value, cIMT = carotid intima-media thickness.

Table 3: Age-adjusted β regression estimates of the effect of miR expression on cIMT stratified by sex. SE= standard deviation, β = linear regression estimates, CI = confidence interval.

Figure 1: Adjusted β linear regression estimates with 95% confidence intervals of the effect on cIMT of a Δ Ct increase (decreased expression) of the different miRs applied to men (A) and women (B) separately. The models are adjusted for RA disease duration, body mass index, age, ischaemic heart disease, ictus, peripheral artery disease, creatinine, hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, disease-modifying antirheumatic drugs, biological agents, corticosteroids, and non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Figure 2: Percentage of cIMT variability (measured with the R-squared statistic) that is accounted for by the different multivariate linear models applied to men and women separately. The regression model 1 included the following variables: RA disease duration, body mass index, age, ischaemic heart disease, ictus, peripheral artery disease, creatinine, hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, disease-

modifying antirheumatic drugs, biological agents, corticosteroids, and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Model 2 included variables from model 1 plus miR-425-5p expression in men and miR-451 expression in women.

Figure 3: Adjusted β linear regression estimates with 95% confidence intervals of the effect on PWV and distensibility of a Δ Ct increase (decreased expression) of the different miRs applied to men and women separately. The models were adjusted for RA disease duration, body mass index, age, ischaemic heart disease, ictus, hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, disease-modifying antirheumatic drugs, biological agents, corticosteroids, and non-steroidal anti-inflammatory drugs.

FUNDING:

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, [FIS PI030786]; Centro de Investigación Biomédica de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM); Fundación Española de Reumatología; and Sociedad Española de Reumatología (SER).

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank all the patients for their essential collaboration.

The results reported in this study were presented as oral communication in the Session: Genomics, genetic basis of disease and antigen presentation, in EULAR 2019 Congress (Paredes S, Taverner D, Ferre R, et al. Ann Rheum Dis 2019; Vol 78, sup 2: A664)

AUTHOR CONTRIBUTORS

Lluís Masana, Silvia Paredes, Delia Taverner and Joan-Carles Vallvé performed the conceptualization of the study and carry out the data curation and the formal analysis. Raimon Ferré measured carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. Silvia Paredes and Delia Taverner selected the patients. Roser Rosales and Joan-Carles Vallvé performed the laboratory analyses. Silvia Paredes, Delia Taverner and Joan-Carles Vallvé wrote the original draft and all authors reviewed and approved the manuscript. All authors supervised and validated the study

COMPETING INTERESTS

The authors report no conflicts of interest in this work

DATA AVAILABILITY

Data are available from the corresponding author upon reasonable request

KEY MESSAGES

- We have identified two miRs associated with surrogate markers of CV disease in RA patients and we provide the first evidence of a possible role of those miRs as useful epigenetic biomarkers to assess CV risk in RA patients.
- We show that decreased plasma expression levels of miR-425-5p are associated in males with a significant increase in subclinical atherosclerosis (cIMT)
- We found that decreases in the expression of miR-451 are significantly associated, in women, with lower values of cIMT and, in the entire RA population, with significant decreases in arterial stiffness (PWV)

Table 1: General characteristics of RA patients overall and stratified by gender

	RA (n=214)	Female (n=138)	Male (n=76)	P value
Characteristics of the groups				
Gender-female (% , n)	64.5 (138)			
Age (years)	58(12)	57 (12)	59 (12)	0.55
Body mass index (kg/m ²)	27.8 (5.9)	27.7 (6.6)	28.1 (4.4)	0.62
Waist circumference (cm)	93 (15)	88 (15)	100 (12)	<0.001
SBP (mmHg)	137 (21)	135 (21)	142 (21)	0.024
DBP (mmHg)	81 (12)	80 (13)	84 (12)	0.025
LDL cholesterol (mg/dL)	119 (31)	118 (31)	120 (31)	0.75
HDL cholesterol (mg/dL)	66 (19)	72 (18)	54 (15)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	105 (55)	102 (54)	112 (58)	0.21
Glucose (mg/dL)	95 (23)	94 (25)	96 (18)	0.35
Current smoker (% , n)	26.2(56)	27.5(38)	23.7(18)	0.34
Hypertension (% , n)	60.3 (129)	53 (73)	74 (56)	0.003
Diabetes mellitus (% , n)	11.7 (25)	10.9 (15)	13.2 (10)	0.62
Dyslipidaemia (% , n)	41.1(88)	39.1 (54)	44.7 (34)	0.425
Disease features				
Disease duration (years)	9.4 (9.1)	10.1 (9.9)	8.2 (7.5)	0.12
DAS28	3.5 (1.3)	3.7 (1.3)	2.98 (1.1)	<0.001
Remission (% , n)	27.1 (58)	20.3 (28)	39.5 (30)	
Low activity (% , n)	18.7 (40)	14.5 (20)	26.3 (20)	
Moderate activity (% , n)	44.4 (95)	52.2 (72)	30.3 (23)	<0.001
High activity (% , n)	9.8 (21)	13 (18)	3.9 (3)	
HAQ	0.45 (0.52)	0.59 (0.56)	0.21 (0.34)	<0.001
Rheumatoid factor+ (% , n)	72.4 (155)	71.7 (99)	73.7 (56)	0.76
ACPA+ (% , n)	81.3 (174)	83.3 (115)	77.6 (59)	0.31
ESR (mm/h)	37 (26)	40 (27)	32 (22)	0.019
CRP (mg/dL)	0.72 (0.83)	0.73 (0.80)	0.70 (0.88)	0.83
Fibrinogen (mg/dL)	443 (97)	442 (96)	444 (100)	0.91
Treatments (% , n)				
DMARDs	75.2 (161)	71.7 (99)	81.6 (62)	0.11
Biological agent	20.1 (43)	23.2 (32)	14.5 (11)	0.13
NSAIDs	57 (122)	57.2 (79)	56.6 (43)	0.92
Corticosteroids	50.9 (109)	53 (73)	47 (36)	0.44

Table 2: Correlations of cIMT with miR expression levels stratified by sex

	cIMT			
	Female n=138		Male n=76	
	r	p	r	p
miR-Let7a	0.049	0.288	0.057	0.318
miR-96	-0.009	0.463	0.1	0.208
miR-381	0.032	0.411	0.058	0.396
miR-425-5p	0.051	0.280	0.122	0.153
miR-451	-0.157	0.035	-0.023	0.427
miR-572	-0.04	0.398	-0.135	0.228

Table 3: Age-adjusted β regression estimates of the effect of miR expression on cIMT stratified by sex

	Female					Male				
	β	SE	95% CI		p	β	SE	95% CI		p
			Lower	Higher				Lower	Higher	
miR-Let7a	0,009	0,008	-0,008	0,02	0.303	0,012	0,013	-0,013	0,038	0.325
miR-96	-0,003	0,005	-0,012	0,007	0.601	0,007	0,008	-0,009	0,022	0.415
miR-381	-0,001	0,005	-0,01	0,01	0.86	0,009	0,01	-0,014	0,03	0.45
miR-425-5p	0,02	0,02	-0,02	0,054	0.37	0,052	0,03	0,001	0,103	0.045
miR-451	-0,046	0,02	-0,08	-0,008	0.019	-0,021	0,03	-0,07	0,03	0.44
miR-572	-0,005	0,008	-0,02	0,01	0.57	-0,001	0,007	-0,02	0,01	0.85

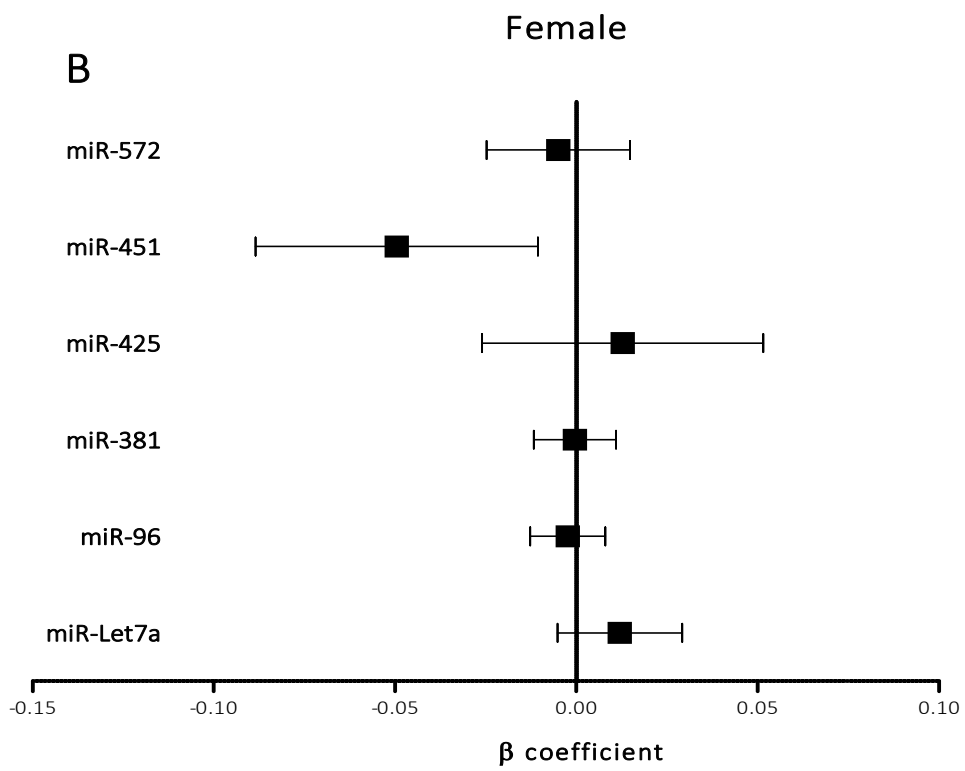
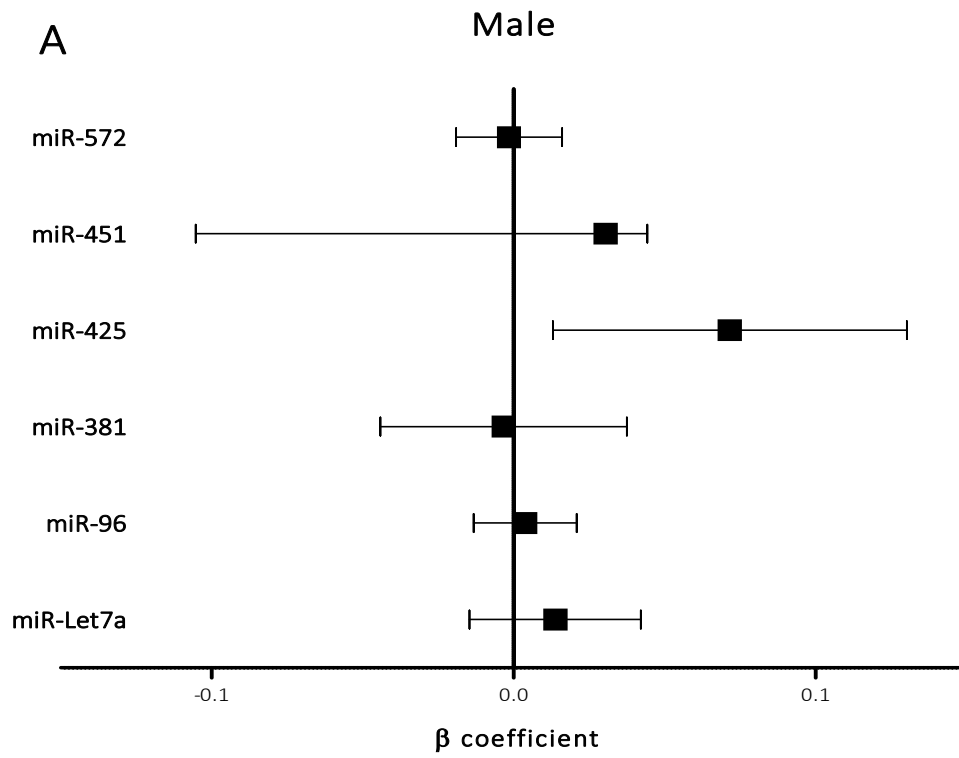


Figura 1

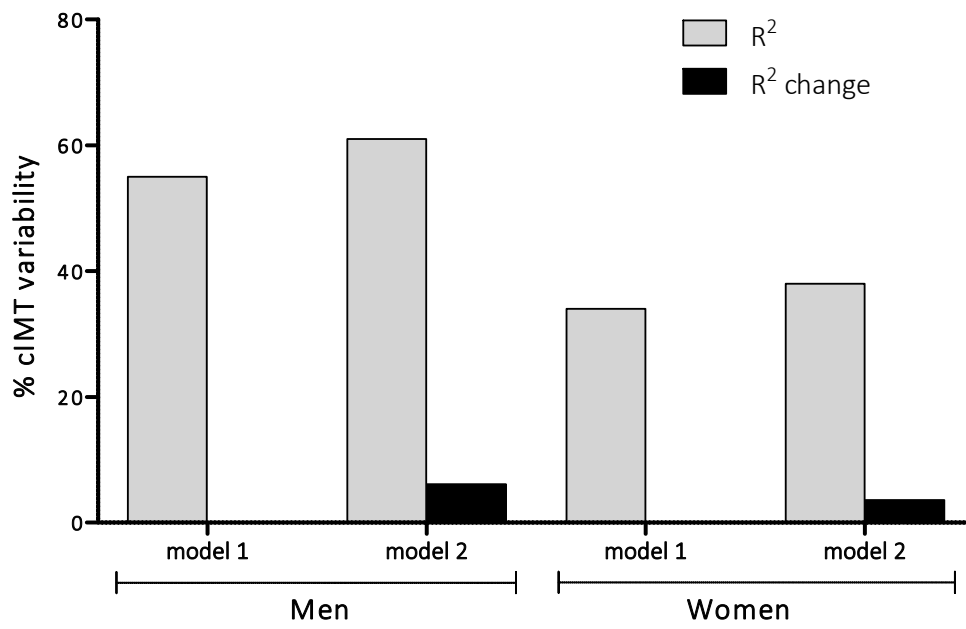


Figura 2

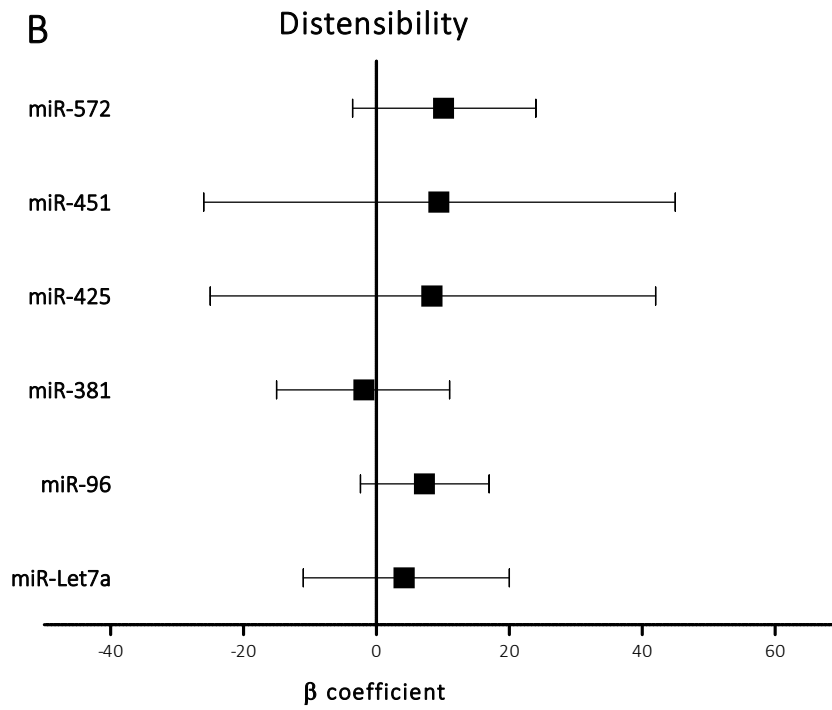
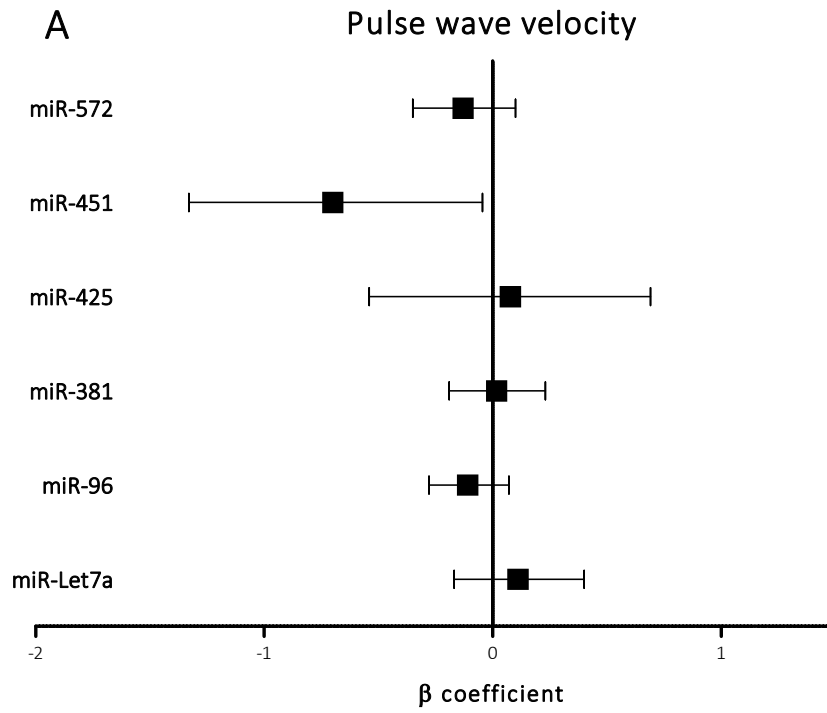


Figura 3

RESUMEN DE RESULTADOS

Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age.

Taverner D, Vallvé JC, Ferré R, Paredes S, Masana L, Castro A.

PLoS One 2018 Mar 1;13(3):e0193690.

Los pacientes con AR presentan un aumento en el riesgo CV y su estado inflamatorio crónico podría contribuir al desarrollo de una arteriosclerosis acelerada. En la literatura se han publicado diversos estudios que relacionan la AR con arteriosclerosis subclínica, medida mediante la valoración por ultrasonidos del GIMc y la presencia de placa, pero los resultados aún son dispares.

Con este estudio se pretende avanzar en el conocimiento de la asociación entre la arteriosclerosis subclínica y las características clínico-analíticas de la enfermedad teniendo en cuenta además la edad y el género de los pacientes de nuestra población.

Los resultados obtenidos más destacados son los siguientes:

1. Características generales de la cohorte (Tabla 1):
Participan en el estudio 214 pacientes con AR con edad media de 58 años, el 64% mujeres. Se observa en hombres un aumento de la PAS y la PAD y del perímetro abdominal y un descenso de las HDL así como del HAQ, VSG y DAS28, comparado con mujeres.
2. Los hombres presentan valores significativamente mayores del GIMc que las mujeres (0,678 mm versus 0,627 mm) y la variable género explica un 3,8% de la variabilidad del GIMc. En concreto, después del ajuste perceptivo, los hombres presentan un aumento de 0,059 mm del GIMc.
3. La edad se correlaciona significativamente con el GIMc explicando esta variable un 16% de la variabilidad del GIMc
4. Se observa una interacción entre edad y género de manera que la correlación entre edad y GIMc es un 12% más pronunciada en hombres que en mujeres (Figura 1) (incremento de 0.0065mm en hombres versus 0.0043 mm en mujeres por cada año de vida).
5. En el análisis multivariante ajustado, se objetiva que DAS28 está significativamente asociado al GIMc en mujeres (0.021 mm de aumento por

- cada unidad de aumento del DAS28) y que explica un 3% significativo de la variabilidad del GIMc (Tabla 3). No se observa asociación entre DAS28 y GIMc en hombres.
6. Al categorizar DAS28 (Figura 2), se observa que el efecto principal de esta variable en ambos sexos no es significativo, de manera que los valores del GIMc no difieren entre los 4 grupos de actividad (remisión, baja actividad, actividad moderada y alta actividad). Sin embargo, el efecto simple de esta variable en mujeres muestra diferencias significativas dado que el GIMc es mayor en las mujeres con alta actividad respecto a las que están en remisión.
 7. Las diferencias del GIMc entre hombres y mujeres son a expensas de los pacientes en remisión dado que en este grupo se observan diferencias significativas en los valores del GIMc, mientras que en los pacientes con actividad baja, moderada o alta no se observan estas diferencias (Figura 2)
 8. No se demuestra asociación entre el GIMc y otras variables clínicas o analíticas relacionadas con la AR.
 9. Un 43% de pacientes con AR presentan placas arterioscleróticas carotídeas, siendo este valor significativamente superior en hombres que en mujeres (57% versus 36%) (Tabla 2).
 10. Las variables significativamente asociadas a la presencia de placa son edad, tabaquismo, VSG y FR positivo mientras que el HAQ se asocia con una reducción de esta probabilidad (Tabla 4).
 11. Todas estas variables explican un 40% de la variabilidad de la presencia de placa arteriosclerótica carotídea en nuestros pacientes con AR.

Conclusiones:

En nuestra cohorte de pacientes con AR, la actividad de la enfermedad (DAS28) y la edad están diferencialmente asociadas con el GIMc en hombres y mujeres. Estos resultados pueden contribuir a explicar los datos contradictorios que se han publicado previamente entre la asociación de DAS28 y la arteriosclerosis subclínica (GIMc). Además, las diferencias entre géneros en relación al GIMc pueden justificarse por un aumento de la incidencia de AR en mujeres y por factores intrínsecos al género femenino que son externos al propio proceso autoinmunitario (por ejemplo, factores genéticos y hormonales).

Assessment of arterial stiffness variables in patients with rheumatoid arthritis. A mediation analysis.

Delia Taverner, Silvia Paredes, Raimon Ferré, Lluís Masana, Antoni Castro, Joan-Carles Vallvé.

Scientific Reports 2019 Mar 14;9(1):4543.

El aumento del riesgo CV observado en pacientes con AR se puede medir determinando parámetros de rigidez arterial. La PWV, el Aix y la distensibilidad carotídea son métodos fiables y no invasivos utilizados para valorar la disfunción endotelial en pacientes con AR. El interés de este estudio radica en valorar la relación de las variables asociadas a rigidez arterial en nuestra población de AR, además de considerar un modelo de análisis de mediación en el caso de la PWV.

Los resultados obtenidos más destacados son los siguientes:

1. Las características generales de la cohorte de estudio están descritas en el artículo anterior. Brevemente, participan 214 pacientes con AR con edad media de 58 años, el 64% mujeres y con una media de duración de la enfermedad de 9 años.
2. Las variables asociadas a la PWV son la edad, la PAS y el IMC. Estas variables explican el 32% de su variabilidad (Tabla 1 suplementaria).
3. El análisis de mediación muestra que el efecto total (c) de la edad sobre la PWV está mediado en parte por efectos indirectos de la PAS (a_1-b_1) y el IMC (a_2-b_2) sobre la PWV (Fig.1; Tabla 3)
4. En esta mediación, el efecto indirecto sobre la PWV a través de la PAS ($a_1-b_1 = 0.023$) tiene una contribución más fuerte que el efecto indirecto a través del IMC ($a_2-b_2 = 0.0065$), siendo el efecto indirecto total ($a_1-b_1 + a_2-b_2$) de 0.0268
5. En conjunto los dos mediadores (PAS y IMC) son responsables de un 28% del efecto total de la edad sobre la PWV, con la PAS y el IMC representando el 21% y el 7% del efecto total de la edad, respectivamente.
6. El análisis muestra que es una mediación parcial dado que el efecto directo significativo de la edad sobre la PWV se reduce de $c = 0.096$ a $c' = 0.069$ aunque permanece significativo.
7. Las variables asociadas a Aix son la edad y el NAT, explicando un 16,5% de su variabilidad.

8. Las variables asociadas a distensibilidad son el IMC y el sexo y explican un 5,6% de su variabilidad.
9. No se observa asociación entre ningún parámetro de rigidez arterial con parámetros de inflamación, duración de la enfermedad, niveles de colesterol ni DAS28.
10. No se observa asociación entre PWV, distensibilidad y Aix con el GIMc y la presencia de placa (Tabla 2 suplementaria).

Conclusiones:

En nuestra cohorte de pacientes con AR, la edad es la variable más importante que determina el aumento de la rigidez arterial (PWV). Se observa, además, que una proporción significativa del efecto negativo de la edad sobre la PWV ocurre a través de un aumento de la PAS y del IMC. En este estudio, los niveles de lípidos y la inflamación no están asociados a un aumento de la rigidez arterial.

MicroRNA differential expression shared between rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction: an exploratory study.

Silvia Paredes, Delia Taverner, Raimon Ferré, Josep Maria Alegret, Lluís Masana, Joan-Carles Vallvé.

Clin Exp Rheumatol. 2019 Sep-Oct,37(5):886-887. Epud 2019 Jun 3.

Existe evidencia de que los pacientes con AR presentan un aumento de mortalidad por patología CV. Los miRNAs son una familia de RNAs pequeños, de unos 18-24 nucleótidos, que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional y se han visto implicados tanto en la AR como en la enfermedad coronaria y la arteriosclerosis. Sin embargo, la asociación de los miRNAs con ECV en pacientes con AR no está bien definida en la actualidad.

Este estudio se plantea como un estudio de descubrimiento para identificar un perfil de miRNAs plasmáticos en pacientes con AR que pueda facilitar el diagnóstico precoz de ECV. Para ello se analiza el perfil plasmático de expresión de 754 miRs en 7 pacientes varones con AR, en 7 pacientes varones con IAM precoz (antes de los 55 años) sin AR y en 7 varones controles apareados por edad y sexo con el objetivo de identificar miRNAs expresados similarmente en los dos grupos de pacientes, pero a diferentes niveles que en controles.

Los resultados obtenidos más destacados son los siguientes:

1. La media de la edad de la población estudiada es de 46 años y el IMC de 26. Ningún paciente es fumador, diabético, hipertenso ni dislipémico. La media de duración de la enfermedad es de 8,4 años.
2. No observamos diferencias en el GIMc entre pacientes con AR y controles.
3. De los 754 miRNAs analizados, se observa que 10 miRNAs (miR-Let-7a, miR-96, miR-381, miR-451, miR-518d, miR-425-5p, miR-572, miR-190b, miR-708 y miR-1180) presentan una expresión plasmática similar en pacientes con AR e IAM y unos niveles infraexpresados significativamente respecto a los controles (Fig.1)
4. Se observa que otros nueve miRNAs están expresados de forma diferente en pacientes con IAM y 16 miRNAs en pacientes con AR al comparar con los controles.

5. Al comparar los pacientes con AR que tienen placa carotídea (3/7) respecto a los que no la tienen se observa una infraexpresión del 23.6%, 34.8%, 25.7%, 4.7% y 0,6% de miR-Let-7a, miR-96, miR-381, miR-451 y miR-425-5p respectivamente.
6. En los pacientes con AR, miR-425-5p se asocia de forma significativa con la PCR y miR-381 con el fibrinógeno.
7. Además, miR-24, miR-146a, miR-191 y miR-223 están sobreexpresados en pacientes con IAM pero no en AR ni en controles lo que sugiere una asociación con riesgo elevado de ECV, independientemente de la inflamación.

Conclusiones:

En este estudio de descubrimiento, se han identificado los siguientes miRNAs; miR-Let-7a, miR-96, miR-381, miR-451, miR-518d, miR-425-5p, miR-572, miR-190b, miR-708 y miR-1180 como posibles biomarcadores epigenéticos de aumento de ECV en pacientes con AR.

Plasma circulating miR-425-5p and miR-451a as biomarkers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients: Association with subclinical atherosclerosis, arterial stiffness and inflammatory parameters

Delia Taverner , Joan-Carles Vallvé, Roser Rosales, Raimon Ferré , Luis Masana, Silvia Paredes.

(Submitted to Rheumatology)

En un estudio previo de descubrimiento realizado en tres grupos de varones (con AR, con IAM sin AR y controles) detectamos 10 miRNAs plasmáticos que podrían ser biomarcadores epigenéticos de aumento de ECV en pacientes con AR. En el presente estudio de validación se pretende comprobar en nuestra cohorte de 214 pacientes con AR, si estos miRNAs se asocian con marcadores subrogados de ECV y si pueden facilitar el diagnóstico precoz de ECV en pacientes con AR.

Los resultados obtenidos más destacados son los siguientes:

1. Mediante análisis ajustados, observamos que los niveles de expresión de miR-425-5p y miR-451 se asocian de forma diferencial al GIMc y a la rigidez arterial en hombres y mujeres afectados de AR.
2. En concreto, en varones un descenso en los valores de expresión plasmática del miR-425-5p se asocian a un aumento significativo del GIMc ($\beta=0.072$) (Fig.1A) y los niveles de expresión de miR-425-5p contribuyen a explicar un 6% de la variabilidad del GIMc en hombres.
3. En mujeres, descensos en la expresión del miR-451 se asocian significativamente a valores inferiores del GIMc ($\beta=-0.05$) (Fig.1B) explicando esta variable un 3,8% de la variabilidad del GIMc en mujeres.
4. En análisis multivariantes ajustados (Fig.3A), se observa que la infraexpresión de miR-451 se asocia a descensos significativos de la rigidez arterial medida mediante la PWV ($\beta=-0.72$), explicando esta variable un 3,6% de la variabilidad de la PWV en toda nuestra cohorte de pacientes AR.
5. Ningún miRNA candidato demuestra una asociación significativa con distensibilidad (Fig.3B).
6. La expresión plasmática de miR-425-5p en hombres, se correlaciona inversamente con la VSG mientras que miR-451 se correlaciona positivamente con DAS28, VSG, PCR y fibrinógeno (Tabla 2 del suplemento).

7. En mujeres, solo el fibrinógeno demuestra correlación con la expresión de miR-451 (Tabla 3 del suplemento).
8. Los niveles plasmáticos del miR-425 y del miR-451-5p no contribuyen a explicar la presencia de placa arteriosclerótica.

Conclusión:

Estos resultados demuestran que descensos en la expresión de miR-425-5p en hombres y de miR-451 en mujeres están asociados con valores elevados y bajos de arteriosclerosis subclínica, respectivamente. Además, descensos en la expresión de miR-451 están asociados con una rigidez arterial menor en toda la cohorte de AR. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de un posible papel de miR-425-5p y miR-451 como biomarcadores epigenéticos útiles para valorar el riesgo CV en pacientes con AR.

DISCUSIÓN GENERAL

En la actualidad ha quedado constancia de que una de las principales comorbilidades y causa de muerte de los pacientes con AR es la ECV [11,80–82,277,278]. Existe suficiente evidencia de que la inflamación sistémica y la disfunción inmune que caracterizan la AR juegan un papel primordial en el desarrollo y aceleración [19] de la arteriosclerosis que explica, al menos en parte, el aumento del riesgo CV [13,279] en estos pacientes.

Aunque desde la EULAR ya se han publicado recomendaciones para el manejo del riesgo CV en los pacientes con AR [119,120], que tienen en cuenta incluso la presencia de factores de riesgo CV nuevos [14], se sigue constatando una mortalidad prematura.

Por ello cada vez existe más interés en incluir nuevos ítems que estratifiquen más estrictamente el riesgo CV de nuestros pacientes. De entre ellos, la valoración por ultrasonidos de alteraciones vasculares preclínicas como el GIMc, la presencia o ausencia de placas arterioscleróticas carotídeas y la rigidez arterial medida con la PWV, tiene especial interés y su uso está cada vez más generalizado entre los reumatólogos [123,280]. Además, en las últimas décadas se ha considerado que factores genéticos y epigenéticos como los miRNAs, tienen un rol importante en el desarrollo de las enfermedades reumáticas.

En la actualidad, existen muy pocos datos sobre la relación que existe entre miRNAs asociados a ECV y a la AR. De manera que en esta tesis nos planteamos investigar el papel de los miRNAs como biomarcadores [270,272,281] que nos señalen aquellos pacientes con AR que tienen un mayor riesgo de presentar ECV.

Así, en esta tesis hemos identificado y validado dos miRNAs plasmáticos (miR-425-5p y miR-451) que se asocian de forma significativa con alteraciones vasculares preclínicas como la arteriosclerosis subclínica y la rigidez arterial, de forma que podrían ser considerados como marcadores epigenéticos para valorar el riesgo CV aumentado que presentan los pacientes con AR.

Inicialmente, en un estudio de descubrimiento [282] estudiamos el perfil plasmático de expresión de 754 miRs y detectamos 10 miRNAs plasmáticos que estaban infraexpresados en 7 pacientes varones con AR y en 7 pacientes con IAM precoz (antes de los 55 años) comparado con 7 varones controles sanos. Estos resultados sugerían que niveles de expresión reducidos de estos miRNAs candidatos podrían indicar un riesgo CV aumentado en pacientes con AR dado que compartían patrón de expresión en ambos grupos de pacientes. Para la validación de estos resultados, posteriormente realizamos un estudio de validación de dichos miRNAs en 214 pacientes con AR y demostramos

que el miR-425-5p y el miR-451 se asociaban al GIMc y a la rigidez arterial de forma diferencial en hombres y mujeres afectados de AR. En concreto, en varones validamos el miR-425-5p ya que observamos que un descenso en los valores de expresión plasmática de éste se asociaba a un aumento significativo del GIMc evaluado como un marcador subrogado de riesgo CV, de manera que los niveles de expresión de este miRNA podrían predecir un aumento en el riesgo futuro CV que presentan los pacientes con AR.

Además, la gran especificidad de actuación biológica que presentan los miRNAs nos ha permitido en el estudio de validación identificar al miR-451 como un marcador protector de riesgo CV en pacientes con AR. Nuevamente, la variable “género” actuó como variable diferenciadora dado que determinamos que específicamente en mujeres, descensos en la expresión del miR-451 se asocian significativamente a valores inferiores del GIMc. Además, observamos en este caso, en toda la población con AR, que descensos en la expresión de este miRNA se asociaban a descensos significativos de la rigidez arterial medida mediante la PWV.

Hasta el momento se habían realizado múltiples estudios de análisis de expresión de miRNAs en sangre periférica. En estos se había demostrado que determinados miRNAs pueden predisponer al desarrollo de una AR y que su expresión puede variar dependiendo del estado y grado de actividad de la enfermedad, además de poderse utilizar como predictores de respuesta al tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados son los primeros en asociar miRNAs específicos con ECV en pacientes con AR.

La asociación que reportamos entre los miRNAs y las alteraciones vasculares preclínicas (GIMc y PWV) es relevante dado que tanto el GIMc como la PWV son variables ampliamente usadas como marcadores subrogados y sensibles de ECV. Diferentes publicaciones han mostrado aumentos en el GIMc en pacientes con AR comparado con controles. Además, en pacientes con ECV o AR, el GIMc es capaz de predecir prospectivamente y de forma independiente a los factores de riesgo CV tradicionales, la aparición de eventos clínicos CV. Respecto al marcador de rigidez arterial, se han descrito valores consistentemente aumentados de PWV en pacientes con AR y estos valores se han descrito como predictores independientes de eventos y mortalidad CV [195,213,283–287]. En concreto se ha descrito que el riesgo de padecer un evento CV mayor aumenta aproximadamente un 14% por cada 1 m/s de aumento de la PWV [288].

En esta tesis hemos caracterizado en profundidad las variables independientemente asociadas al GIMc y a la PWV en nuestra población de AR. En el primer estudio observamos que la media del GIMc de nuestros pacientes resulta de 0.645mm, datos similares a los observados anteriormente por otros autores [141,142] aunque inferiores a otros estudios en los que reportan un GIMc superior a 0,9 mm como valor con un alto poder predictivo de desarrollo de eventos CV a 5 años de seguimiento [135,143].

En nuestra población con AR el género de nuestros pacientes es clave para una correcta interpretación de los resultados, ya que además de las diferentes asociaciones observadas en hombres y mujeres entre la expresión de miR-425-5p y de miR-451 con el GIMc y la PWV, el género también determina diferencias entre las variables que miden las alteraciones vasculares preclínicas, básicamente el GIMc. En concreto, observamos que los hombres con AR tienen valores del GIMc superiores a las mujeres, pero estas diferencias son a expensas de los pacientes en remisión y baja actividad determinada con el DAS28. A medida que aumenta la actividad de la enfermedad desaparecen estas diferencias y las mujeres equiparan los valores del GIMc con los hombres. Además, las mujeres con alta actividad presentan valores del GIMc significativamente superiores a las mujeres en remisión y estas diferencias no se observan en los hombres. Existen datos con asociaciones significativas, pero también datos sin asociación entre el GIMc y DAS28 [153,164,172] aunque en estos estudios no se evaluó la influencia del género. Las discordancias en cuanto a la asociación del GIMc y DAS28 entre géneros, podrían explicarse si tenemos en cuenta la mayor percepción del dolor y la menor fuerza muscular de las mujeres, así como por la sobreestimación de los hombres sobre su capacidad funcional [289]. Por otro lado, para las variables de rigidez arterial, el género no juega un papel tan importante dado que no observamos asociación con la PWV aunque hemos descrito por primera vez una asociación con la distensibilidad de las arterias de los pacientes con AR.

Las diferencias observadas en nuestro estudio entre hombres y mujeres podrían tener diversas explicaciones. Una de ellas es que la prevalencia de los factores de riesgo CV tradicionales es distinta entre hombres y mujeres [290]. Además la actividad de la enfermedad parece ser peor en las mujeres que en los hombres [291]. Finalmente, podrían existir factores genéticos y hormonales intrínsecos al sexo femenino y que son externos a la propia enfermedad que expliquen estas disparidades [292,293].

En nuestra población con AR la edad de los pacientes ha sido la variable con una asociación más fuerte tanto al GIMc como a la PWV y a la presencia de placas

arterioscleróticas, aunque no se asoció a los niveles de miRNAs estudiados. La edad es una variable clave en la evolución del proceso arteriosclerótico y se ha asociado ampliamente con un aumento del GIMc en diversas poblaciones, en diferentes estudios [294,295] y se ha identificado como un predictor independiente de rigidez arterial en pacientes con AR [158,296–298]. Además de estos datos conocidos, en esta tesis hemos avanzado en el estudio de estas asociaciones, ya que observamos por primera vez una interacción significativa entre la edad y el género de los pacientes al estudiar la asociación con el GIMc de manera que determinamos que la correlación positiva entre edad y GIMc era un 12% más pronunciada en hombres que en mujeres. Esto sugiere una tasa más rápida de aumento del GIMc en hombres con AR que en mujeres a medida que aumenta la edad.

Además, la edad se ha determinado previamente como un factor independiente de rigidez arterial en pacientes con AR junto con la PAS y el IMC [297]. En el estudio de Nur Sirin et al., la edad y la PAS resultan predictores de rigidez carotídea local de acuerdo con los resultados de un análisis multivariante de regresión logística [299].

En la literatura está descrito que en la AR existen aumentos significativos en la PWV y estos aumentos correlacionan con GIMc más elevados [157–161]. Sin embargo, existen múltiples publicaciones con resultados dispares en cuanto a las variables que se relacionan con la PWV. Por estos resultados contradictorios publicados hasta el momento, nuestro grupo decidió investigar, mediante un análisis de mediación, las variables que podrían afectar tanto de forma directa como indirecta la relación entre la PWV y la edad. Demostramos que el 28% del efecto total de la edad sobre la PWV estaba mediado por la PAS en un 21% y por el IMC en un 7%, mientras que el 72% restante del efecto total se explicaba por la edad exclusivamente. Aunque estos resultados tienen sentido ya que se ha demostrado previamente que estas dos variables afectan de forma independiente a la PWV [92,160], el análisis por mediación no se había realizado hasta el momento.

La interacción entre edad y género detectada al estudiar el GIMc ha condicionado todos los estudios posteriores que realizamos ya que para eliminar la confusión de esta interacción era necesario llevar a cabo los análisis estratificando la población con AR en hombres y mujeres. Sin embargo, esta interacción no se observó para las otras variables vasculares, ni a la hora de valorar las variables que afectaban los niveles de expresión de los diferentes miRNAs.

Existe una evidencia importante en la literatura que muestra que diferentes miRNAs

juegan papeles centrales en la fisiopatología de la AR y de la ECV. Por ejemplo, Pauley et al. [188] observan, en pacientes con AR, un aumento de entre 1,8 y 2,6 de miR-16, miR-132, miR-146a y miR-155 en CMSP respecto de controles sanos, correlacionado con la actividad de la enfermedad en caso de miR-16 y miR-146a. Otros grupos también han relacionado los niveles de expresión de miR-16 con el DAS28 [215] y de miR-233 con DAS28 y PCR [208]. Paralelamente Guo-Kun Wang et al. [252] hipotetizan que los miRNAs específicos del tejido cardíaco podrían liberarse al torrente sanguíneo durante un IAM y por tanto podrían ser utilizados para detectar y monitorizar la lesión miocárdica. Sin embargo, hasta el momento en la literatura no existen prácticamente publicaciones que relacionen miRNAs específicos con ECV en pacientes con AR. En un estudio de López-Pedreira et al. [283] publicado en 2012 ya se apunta a la importancia de la sobreexpresión de miR-146a tanto en AR como en SCA, por lo que se hipotetiza que miR-146a podría estar directamente involucrado en la patogénesis de la ECV en pacientes con AR. Más recientemente Ormseth et al. [274] valoran la asociación entre miRNAs plasmáticos y actividad de la AR (medida mediante el índice DAS28-VSG) y calcificación vascular coronaria. En el estudio se incluyen 168 pacientes con AR y 91 controles y tras valorar siete miRNAs plasmáticos candidatos (por relevancia biológica, por diagnóstico de AR y por su uso como marcadores de actividad de la enfermedad y de arteriosclerosis subclínica en AR), se miden las concentraciones plasmáticas de miR-15a-5p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-125a-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p y miR-223-3p por PCR cuantitativa. Los pacientes con AR tuvieron concentraciones plasmáticas más elevadas de todos los miRNAs respecto a los controles siendo la combinación de miR-24-3p, miR-26a-5p y miR-125a-5p la más significativa para el diagnóstico de AR. Entre los pacientes con AR con FR negativo, miR-24-3p fue el marcador diagnóstico más potente. En cuanto a la actividad de la enfermedad, sólo miR-155-5p se asoció débilmente y de forma inversa con la actividad de la enfermedad (concretamente con el NAT). A la hora de evaluar si estos miRNAs se asociaban a factores de riesgo CV en estos pacientes, ninguno demostró asociación con el score de calcificación vascular coronaria. Solo miR-125a-5p se asoció débilmente a la PAD y miR-26a-5p al score de riesgo de Framingham.

Respecto a los miRNAs identificados en esta tesis, diversos estudios han demostrado que tanto miR-425-5p como miR-451 participan en la fisiopatología de la AR y de la ECV de forma independiente. Aunque principalmente se han asociado al inicio y desarrollo de procesos biológicos como la nefropatía diabética, el dolor inflamatorio

crónico y sobre todo a diversos cánceres [300,301], también existen estudios en los que se demuestra que miR-425-5p regula la fibrosis cardíaca y podría ser un biomarcador de predicción de fallo cardíaco [284,302]. Además se ha demostrado que la infraexpresión de miR-451 puede contribuir al desarrollo de miocardiopatía hipertrófica [303] e incluso que el tratamiento con estatinas podría disminuir los niveles de este miRNA considerándolo como un nuevo biomarcador que valore la eficacia de las estatinas en pacientes con angina inestable [286]. En cuanto a la AR, recientemente en el grupo de Balzano et. al se demuestra que la expresión de miR-425-5p, entre otros, es menor en pacientes con AR respecto a controles de forma significativa y se observa incluso relación entre el tratamiento con corticoides y la expresión de miRNAs [213] con el desarrollo de arteriosclerosis subclínica en pacientes con AR. Además, en esta población, miR-451 se encuentra sobreexpresado en plasma y se ha implicado en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis. También se ha demostrado que inhibe la proliferación de los FS y la producción de citoquinas de pacientes con AR por lo que podría considerarse como una terapia futura en la AR [304]. En otros estudios experimentales en ratas se han postulado nuevos posibles biomarcadores de actividad de la enfermedad y de respuesta al tratamiento entre los que se encontraría miR-451 [195]. El mecanismo molecular subyacente a los cambios en los niveles plasmáticos de miR-451 y miR-425-5p no ha sido abordado en este estudio. En general, los miRs plasmáticos circulantes pueden originarse por una actuación activa celular al ser enviados y transportados a células vecinas con consecuencias funcionales sobre estas células, pero también pueden reflejar procesos celulares alterados que liberen estos miRs a la circulación. Sin embargo, el efecto diferencial del miR-425-5p y del miR-451 sobre el GIMc sugiere una alta especificidad de actuación de estos miRs pudiéndose especular que sus bajas concentraciones se asociarían a una incapacidad para inhibir la expresión de sus genes diana, que de esta forma estarían sobre-expresados y serían nocivos para el desarrollo arteriosclerótico.

Además, en esta tesis también hemos observado que la expresión plasmática de miR-425-5p en hombres, se correlaciona inversamente con la VSG, mientras que miR-451 se correlaciona positivamente con DAS28, VSG, PCR y fibrinógeno. En mujeres, solo el fibrinógeno demuestra correlación con la expresión de miR-451. Estas correlaciones contradictorias indicarían que posiblemente los efectos de los miRs sobre el GIMc y la PWV observados en nuestro estudio no estarían mediados a través de los parámetros clásicos inflamatorios y de actividad de la enfermedad sino a través de otros mediadores

y seguramente modulados por factores genéticos. La asociación entre miRs e inflamación o actividad de la enfermedad en AR se ha descrito en la bibliografía aunque no de forma contundente ya que de los múltiples miRs asociados a AR, son pocos los que han demostrado una relación significativa con la inflamación y la actividad de la enfermedad. Por ejemplo, miR-146a, que se ha descrito sobreexpresado en sangre periférica de pacientes con AR, se correlaciona de forma positiva con la VSG, mientras que otros miRNAs, como miR-16 [215] y miR-233 se han relacionado con el DAS28 y este último, en pacientes con AR de inicio, también con la PCR [305]. Además, en nuestro primer estudio observamos que la actividad de la enfermedad determinada por el DAS28 se asoció con un aumento del GIMc en mujeres, pero no observamos asociación con las variables de rigidez arterial. Estas diferencias muestran que, aunque el GIMc y la PWV son marcadores de alteraciones vasculares preclínicas, el proceso de remodelado de la pared arterial no está del todo entendido en pacientes con AR.

Asimismo, en el análisis de la asociación de las variables inflamatorias con arteriosclerosis subclínica y rigidez arterial, existen resultados contradictorios en la literatura. Algunas publicaciones abogan a favor de que a mayor inflamación sistémica medida por VSG y PCR, mayor GIMc [144,147]. Sin embargo y a pesar de que todo lo reflejado anteriormente haría suponer tales asociaciones como lógicas, nuestro grupo [306] no ha demostrado asociación estadísticamente significativa de las variables inflamatorias con el GIMc. Otros estudios publicados están en concordancia con nuestros resultados [171,175] y las posibles explicaciones serían los bajos niveles de inflamación de los pacientes incluidos, la valoración puntual de la inflamación que no refleja de forma adecuada los niveles fluctuantes de inflamación característicos de la AR y la interacción de los fármacos utilizados. También los parámetros de inflamación como la PCR podrían tener un valor predictivo con el aumento de la rigidez arterial [162]. En un meta-análisis de Ambrosino et al. [158,297] se concluye que en la AR, la rigidez arterial está aumentada y además en los modelos de regresión se demuestra que un estado inflamatorio más severo impacta significativamente en la PWV y el AIX, ya desde los estadios más precoces de la enfermedad. Nuestro grupo no objetiva relación significativa entre rigidez arterial y las variables inflamatorias, la actividad y la duración de la enfermedad y dicha discrepancia en cuanto a los resultados observados se podría explicar por los niveles modestos de los parámetros inflamatorios (un 45.8% de nuestros pacientes tienen una baja actividad o están en remisión) así como a la duración de la enfermedad relativamente corta de nuestros pacientes, con una media de 9 años de

duración.

En esta tesis los niveles plasmáticos del miR-425 y del miR-451-5p no han contribuido a explicar la presencia de placa arteriosclerótica. Además, aunque la PWV y el AIx se han asociado independientemente con el GIMc y con la presencia de placas arterioscleróticas en pacientes con AR, en nuestra serie de pacientes no observamos asociación entre PWV, distensibilidad y AIx con el GIMc y la presencia de placa. Otros estudios tampoco han encontrado estas asociaciones y por tanto la cuestión de si la rigidez arterial aumenta el riesgo CV aumentando el proceso arteriosclerótico permanece por definir.

El 43,5% de los pacientes de nuestra serie presentan placa carotídea, un dato ligeramente superior al 33% descrito previamente [133]. Hemos encontrado variables predictoras independientes de presencia de placa que ya se habían publicado previamente como la edad, el hábito tabáquico, el HAQ, la VSG y el FR positivo [176,307]. Destacar de nuestro estudio que a diferencia de los resultados publicados previamente [308], los valores de HAQ correlacionan positivamente con un menor riesgo de presentar placa arteriosclerótica. Este resultado se podría explicar por el diseño transversal del estudio, por la falta de análisis del daño radiográfico o por el carácter subjetivo de dicho parámetro. Además se observan diferencias entre algunas de las variables que se asocian al GIMc y a la presencia de placa. Quizás la explicación de dichas diferencias radica en que ambas variables representan estadios y procesos fisiopatológicos diferentes dentro de la arteriosclerosis, de manera que el GIMc refleja el engrosamiento de la capa muscular de la media, mientras que la formación de la placa es resultado del engrosamiento de la íntima. Además, la formación de placa se considera un estadio tardío del proceso arteriosclerótico que progresa desde la estría grasa inicial hasta la placa ateromatosa avanzada.

A la hora de estudiar como influyen las variables serológicas propias de la AR en las alteraciones vasculares preclínicas nos encontramos con resultados dispares en la literatura. Algunos estudios encuentran relación entre la positividad del FR y los ACPA con el GIMc [169,309] y con la PWV [280], sin embargo otros grupos no encuentran correlación positiva entre PWV y ACPA [310] ni entre GIMc y variables serológicas [171,175]. En el estudio realizado por nuestro grupo no hemos demostrado asociación estadísticamente significativa entre las variables inflamatorias y los marcadores serológicos con el GIMc.

En nuestra población de AR, un 41% de nuestros pacientes tienen dislipemia. En la literatura hay estudios que demuestran que la carga inflamatoria se asocia con mayor arteriosclerosis subclínica [311,312]. En nuestro caso solo observamos en mujeres una asociación significativa con la presencia de HDL bajo, de manera que las mujeres con un HDL bajo presentan un aumento significativo de 0.06 mm en los valores del GIMc. El HDL ejerce un efecto ateroprotector por sus propiedades antioxidantes, promotoras del transporte reverso de colesterol y anti-inflamatorias, esta última al disminuir la expresión de moléculas de adhesión endoteliales. Diferentes estudios han demostrado que procesos inflamatorios crónicos como la AR alteran no solo la funcionalidad del HDL sino que además inducen cambios composicionales proinflamatorios [92,312]. Además, nuestro grupo no ha demostrado una significación estadística entre dislipemia y rigidez arterial a pesar de que se sabe que el colesterol alto condiciona una reducción en la elasticidad arterial [313]. De todo esto se desprende que las medidas estáticas de los valores clásicos lipídicos no son suficientes y se requieren medidas más especializadas (tamaño y concentración de subfracciones lipídicas, cambios composicionales y funcionalidad) para proporcionar información clínicamente útil. Así pues, los resultados de nuestro estudio demuestran que descensos en la expresión de miR-425-5p en hombres y de miR-451 en mujeres se asocian a mayores y menores valores de arteriosclerosis subclínica respectivamente. Además la infraexpresión de miR-451 se asocia a menor rigidez arterial en toda la población de AR estudiada, de manera que este estudio aporta la primera evidencia de un posible papel de miR-425-5p y miR-451 como biomarcadores epigenéticos útiles para valorar el riesgo CV en pacientes con AR.

CONCLUSIONES

1. Del **objetivo 1** que pretende caracterizar las alteraciones vasculares preclínicas en nuestra población de pacientes con AR podemos concluir que:
 - a. Los hombres con AR presentan valores significativamente mayores del GIMc que las mujeres (0,678 mm vs 0,627 mm).
 - b. La edad se correlaciona significativamente con el GIMc.
 - c. Se observa una interacción entre edad y género de manera que dicha correlación es un 12% más pronunciada en hombres que en mujeres.
 - d. El DAS28 se asocia diferencialmente con el GIMc entre hombres y mujeres con AR. Así pues el GIMc es mayor en las mujeres con alta actividad respecto a las que están en remisión. Sin embargo, no se observa asociación entre DAS28 y GIMc en hombres.
 - e. Las variables significativamente asociadas a la presencia de placa son edad, tabaquismo, VSG y FR positivo mientras que el HAQ se asocia con una reducción de esta probabilidad.
 - f. La edad es la variable más importante que determina el aumento de la PWV.
 - g. Una proporción significativa del efecto negativo que tiene la edad sobre la PWV se explica a través del aumento de la PAS y del IMC.
 - h. Las variables asociadas a Aix son la edad y el NAT.
 - i. Las variables asociadas a distensibilidad son el IMC y el sexo.

2. Del **objetivo 2** que pretende determinar un perfil plasmático de microRNAs común en pacientes con AR sin ECV preclínica y en pacientes con cardiopatía isquémica sin AR y diferente al de controles sanos para identificar a los pacientes con AR en riesgo de desarrollar ECV, podemos concluir que:
 - a. miR-Let-7a, miR-96, miR-381, miR-451, miR-518d, miR-425-5p, miR-572, miR-190b, miR-708 y miR-1180 son posibles biomarcadores epigenéticos de aumento de ECV en pacientes con AR.

3. Del **objetivo 3** que pretende validar en una cohorte de pacientes con AR los microRNA plasmáticos identificados podemos concluir que:

- a. La infraexpresión de miR-425-5p en varones se asocia a un aumento significativo del GIMc.
- b. La infraexpresión de miR-451 en mujeres se asocia a valores inferiores del GIMc.
- c. En toda nuestra población con AR, la infraexpresión de miR-451 se asocia a descensos significativos de la PWV.
- d. Los niveles plasmáticos de miR-425 y del miR-451-5p no contribuyen a explicar la presencia de placa arteriosclerótica.
- e. miR-425-5p y miR-451 son posibles biomarcadores epigenéticos útiles para valorar el riesgo CV en pacientes con AR.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 2005;**4**:130–6. doi:10.1016/j.autrev.2004.09.002
- 2 Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, *et al.* Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis and rheumatism* 2010;**62**:1576–82. doi:10.1002/art.27425
- 3 Carbonell J, Cobo T, Balsa A, *et al.* The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford, England)* 2008;**47**:1088–92. doi:10.1093/rheumatology/ken205
- 4 Hunter TM, Boytsov NN, Zhang X, *et al.* Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014. *Rheumatology International* 2017;**37**:1551–7. doi:10.1007/s00296-017-3726-1
- 5 Carmona L. Epidemiología de la artritis reumatoide. *Revista Española de Reumatología* 2002;**29**:86–90.
- 6 Lajas C, Abasolo L, Bellajdel B, *et al.* Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study. *Arthritis and rheumatism* 2003;**49**:64–70. doi:10.1002/art.10905
- 7 Ruiz-Montesinos MD, Hernández-Cruz B, Ariza-Ariza R, *et al.* [Cost analysis in a cohort of rheumatoid arthritis patients managed in rheumatology units in Spain]. *Reumatología clinica* 2005;**1**:193–9. doi:10.1016/S1699-258X(05)72744-3
- 8 Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, *et al.* Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2013;**80**:29–33. doi:10.1016/j.jbspin.2012.02.005
- 9 Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, *et al.* The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis and rheumatism* 2007;**56**:3583–7. doi:10.1002/art.22979
- 10 Symmons DP, Jones MA, Scott DL, *et al.* Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *The Journal of rheumatology* 1998;**25**:1072–7.
- 11 Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, *et al.* Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the rheumatic diseases* 2012;**71**:1524–9. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200726

- 12 Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, *et al.* Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis and rheumatism* 2008;**59**:1690–7. doi:10.1002/art.24092
- 13 Graf J, Scherzer R, Grunfeld C, *et al.* Levels of C-reactive protein associated with high and very high cardiovascular risk are prevalent in patients with rheumatoid arthritis. *PloS one* 2009;**4**:e6242. doi:10.1371/journal.pone.0006242
- 14 del Rincón ID, Williams K, Stern MP, *et al.* High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2737–45.
- 15 Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, *et al.* Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2005;**32**:435–42.
- 16 Abasolo L, Ivorra-Cortes J, Leon L, *et al.* Influence of demographic and clinical factors on the mortality rate of a rheumatoid arthritis cohort: A 20-year survival study. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2016;**45**:533–8. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.10.016
- 17 Goodson NJ, Wiles NJ, Lunt M, *et al.* Mortality in early inflammatory polyarthritis: cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis and rheumatism* 2002;**46**:2010–9. doi:10.1002/art.10419
- 18 Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, *et al.* Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:54–8. doi:10.1002/art.10705
- 19 Gabriel SE. Why do people with rheumatoid arthritis still die prematurely? *Annals of the rheumatic diseases* 2008;**67 Suppl 3**:iii30-4. doi:10.1136/ard.2008.098038
- 20 Wotton CJ, Goldacre MJ. Risk of invasive pneumococcal disease in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record linkage cohort analyses. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2012;**66**:1177–81. doi:10.1136/jech-2011-200168
- 21 Liao KP, Solomon DH. Traditional cardiovascular risk factors, inflammation and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2013;**52**:45–52. doi:10.1093/rheumatology/kes243
- 22 Dougados M, Soubrier M, Antunez A, *et al.* Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an

- international, cross-sectional study (COMORA). *Annals of the rheumatic diseases* 2014;**73**:62–8. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204223
- 23 Balsa A, Lojo-Oliveira L, Alperi-López M, *et al.* Prevalence of Comorbidities in Rheumatoid Arthritis and Evaluation of Their Monitoring in Clinical Practice: The Spanish Cohort of the COMORA Study. *Reumatologia clinica* Published Online First: 12 July 2017. doi:10.1016/j.reuma.2017.06.002
- 24 van Halm VP, Peters MJL, Voskuyl AE, *et al.* Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;**68**:1395–400. doi:10.1136/ard.2008.094151
- 25 Meune C, Touzé E, Trinquart L, *et al.* High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Archives of cardiovascular diseases* 2010;**103**:253–61. doi:10.1016/j.acvd.2010.03.007
- 26 Nurmohamed MT, Heslinga M, Kitas GD. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology* 2015;**11**:693–704. doi:10.1038/nrrheum.2015.112
- 27 Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, *et al.* Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy* 2008;**10**:R30. doi:10.1186/ar2383
- 28 del Rincón I, Freeman GL, Haas RW, *et al.* Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis and rheumatism* 2005;**52**:3413–23. doi:10.1002/art.21397
- 29 Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, *et al.* A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2008;**10**:R45. doi:10.1186/ar2404
- 30 Turesson C, Matteson EL. Malignancy as a comorbidity in rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford, England)* 2013;**52**:5–14. doi:10.1093/rheumatology/kes189
- 31 Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, *et al.* A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2008;**10**:R45. doi:10.1186/ar2404
- 32 Parikh-Patel A, White RH, Allen M, *et al.* Risk of cancer among rheumatoid

- arthritis patients in California. *Cancer Causes & Control* 2009;**20**:1001–10.
doi:10.1007/s10552-009-9298-y
- 33 Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, *et al.* Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014;**73**:529–35. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204575
- 34 Lake F, Proudman S. Rheumatoid Arthritis and Lung Disease: From Mechanisms to a Practical Approach. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2014;**35**:222–38. doi:10.1055/s-0034-1371542
- 35 Bongartz T, Nannini C, Medina-Velasquez YF, *et al.* Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 2010;**62**:1583–91. doi:10.1002/art.27405
- 36 Ungprasert P, Srivali N, Cheungpasitporn W, *et al.* Risk of incident chronic obstructive pulmonary disease in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2016;**83**:290–4.
doi:10.1016/j.jbspin.2015.05.016
- 37 van Staa TP, Geusens P, Bijlsma JWJ, *et al.* Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006;**54**:3104–12. doi:10.1002/art.22117
- 38 El Maghraoui A, Sadni S, Rezqi A, *et al.* Does Rheumatoid Cachexia Predispose Patients with Rheumatoid Arthritis to Osteoporosis and Vertebral Fractures? *The Journal of Rheumatology* 2015;**42**:1556–62. doi:10.3899/jrheum.141629
- 39 Appenzeller S, Bertolo MB, Costallat LTL. Cognitive impairment in rheumatoid arthritis. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 2004;**26**:339–43.
- 40 Shin SY, Katz P, Wallhagen M, *et al.* Cognitive impairment in persons with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research* 2012;:n/a-n/a.
doi:10.1002/acr.21683
- 41 Matcham F, Rayner L, Steer S, *et al.* The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology* 2013;**52**:2136–48. doi:10.1093/rheumatology/ket169
- 42 Covic T, Cumming SR, Pallant JF, *et al.* Depression and anxiety in patients with rheumatoid arthritis: prevalence rates based on a comparison of the Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS) and the hospital, Anxiety and Depression Scale

- (HADS). *BMC psychiatry* 2012;**12**:6. doi:10.1186/1471-244X-12-6
- 43 Joaquim AF, Appenzeller S. Neuropsychiatric manifestations in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 2015;**14**:1116–22. doi:10.1016/j.autrev.2015.07.015
- 44 Doran MF, Crowson CS, Pond GR, *et al.* Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: a population-based study. *Arthritis and rheumatism* 2002;**46**:2287–93. doi:10.1002/art.10524
- 45 Lacaille D, Guh DP, Abrahamowicz M, *et al.* Use of nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs and risk of infection in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2008;**59**:1074–81. doi:10.1002/art.23913
- 46 Franklin J, Lunt M, Bunn D, *et al.* Risk and predictors of infection leading to hospitalisation in a large primary-care-derived cohort of patients with inflammatory polyarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007;**66**:308–12. doi:10.1136/ard.2006.057265
- 47 Brassard P, Lowe A-M, Bernatsky S, *et al.* Rheumatoid arthritis, its treatments, and the risk of tuberculosis in Quebec, Canada. *Arthritis and rheumatism* 2009;**61**:300–4. doi:10.1002/art.24476
- 48 Wolfe F, Michaud K, Anderson J, *et al.* Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis & Rheumatism* 2004;**50**:372–9. doi:10.1002/art.20009
- 49 Brassard P, Kezouh A, Suissa S. Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;**43**:717–22. doi:10.1086/506935
- 50 Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, *et al.* Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis and rheumatism* 2006;**55**:19–26. doi:10.1002/art.21705
- 51 Smitten AL, Choi HK, Hochberg MC, *et al.* The risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis in the United States and the United Kingdom. *Arthritis and rheumatism* 2007;**57**:1431–8. doi:10.1002/art.23112
- 52 Bordy R, Totuson P, Prati C, *et al.* Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology* 2018;**14**:404–20. doi:10.1038/s41584-018-0022-8
- 53 Jensen HA, Mehta JL. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert review of cardiovascular therapy* 2016;**14**:1021–33.

- doi:10.1080/14779072.2016.1207527
- 54 Mangoni AA, Zinellu A, Sotgia S, *et al.* Protective Effects of Methotrexate against Proatherosclerotic Cytokines: A Review of the Evidence. *Mediators of inflammation* 2017;**2017**:9632846. doi:10.1155/2017/9632846
- 55 Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *The Lancet* 2010;**375**:132–40. doi:10.1016/S0140-6736(09)61717-7
- 56 Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, *et al.* Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet (London, England)* 2009;**373**:1175–82. doi:10.1016/S0140-6736(09)60447-5
- 57 Bohula EA, Giugliano RP, Leiter LA, *et al.* Inflammatory and Cholesterol Risk in the FOURIER Trial. *Circulation* 2018;**138**:131–40. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034032
- 58 Pradhan AD, Aday AW, Rose LM, *et al.* Residual Inflammatory Risk on Treatment With PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation* 2018;**138**:141–9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034645
- 59 Cui G, Wang H, Li R, *et al.* Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation* 2012;**9**:235. doi:10.1186/1742-2094-9-235
- 60 Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, *et al.* Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;**101**:2149–53.
- 61 Ríos-Navarro C, de Pablo C, Collado-Díaz V, *et al.* Differential effects of anti-TNF- α and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *European journal of pharmacology* 2015;**765**:355–65. doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.054
- 62 Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, *et al.* Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *The Journal of clinical investigation* 1985;**76**:2003–11. doi:10.1172/JCI112200
- 63 Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, *et al.* Inhibition of interleukin-1 by

- anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2008;**117**:2662–9.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731877
- 64 Ridker PM, Everett BM, Thuren T, *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine* 2017;**377**:1119–31. doi:10.1056/NEJMoa1707914
- 65 Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, *et al.* Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation research* 2004;**94**:534–41.
doi:10.1161/01.RES.0000115557.25127.8D
- 66 Nawawi H, Osman NS, Annuar R, *et al.* Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis* 2003;**169**:283–91.
- 67 Mahmud A, Feely J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2005;**46**:1118–22.
doi:10.1161/01.HYP.0000185463.27209.b0
- 68 Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, *et al.* Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European Heart Journal* 2014;**35**:578–89. doi:10.1093/eurheartj/eh367
- 69 Protogerou AD, Zampeli E, Fragiadaki K, *et al.* A pilot study of endothelial dysfunction and aortic stiffness after interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2011;**219**:734–6.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.015
- 70 Ruiz-Limón P, Ortega R, Arias de la Rosa I, *et al.* Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Translational Research* 2017;**183**:87–103. doi:10.1016/j.trsl.2016.12.003
- 71 Mariño K, Bones J, Kattla JJ, *et al.* A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology* 2010;**6**:713–23. doi:10.1038/nchembio.437
- 72 Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, *et al.* The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology* 2007;**25**:21–50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702

- 73 Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;**126**:855–67. doi:10.1016/j.cell.2006.08.019
- 74 Schachter H, Freeze HH. Glycosylation diseases: quo vadis? *Biochimica et biophysica acta* 2009;**1792**:925–30. doi:10.1016/j.bbadis.2008.11.002
- 75 van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* 2008;**9**:593–601. doi:10.1038/ni.f.203
- 76 Hart GW, Copeland RJ. Glycomics Hits the Big Time. *Cell* 2010;**143**:672–6. doi:10.1016/j.cell.2010.11.008
- 77 McCarthy C, Saldova R, Wormald MR, *et al.* The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1 antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions. *Journal of proteome research* 2014;**13**:3131–43. doi:10.1021/pr500146y
- 78 Connelly MA, Gruppen EG, Wolak-Dinsmore J, *et al.* GlycA, a marker of acute phase glycoproteins, and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: PREVEND study. *Clinica Chimica Acta* 2016;**452**:10–7. doi:10.1016/j.cca.2015.11.001
- 79 Bell JD, Brown JC, Nicholson JK, *et al.* Assignment of resonances for ‘acute-phase’ glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma. *FEBS letters* 1987;**215**:311–5.
- 80 Castañeda S, Martín-Martínez MA, González-Juanatey C, *et al.* Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2015;**44**:618–26. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.12.002
- 81 Meissner Y, Zink A, Kekow J, *et al.* Impact of disease activity and treatment of comorbidities on the risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2016;**18**:183. doi:10.1186/s13075-016-1077-z
- 82 Liao KP. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Trends in cardiovascular medicine* Published Online First: 3 August 2016. doi:10.1016/j.tcm.2016.07.006
- 83 Gullick NJ, Scott DL. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology* 2011;**25**:469–83. doi:10.1016/j.berh.2011.10.009
- 84 Zegkos T, Kitis G, Dimitroulas T. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis:

- assessment, management and next steps. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 2016;**8**:86–101. doi:10.1177/1759720X16643340
- 85 Salmon JE, Roman MJ. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The American journal of medicine* 2008;**121**:S3-8. doi:10.1016/j.amjmed.2008.06.010
- 86 Fransen J, Kazemi-Bajestani SMR, Bredie SJH, *et al.* Rheumatoid Arthritis Disadvantages Younger Patients for Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis. *PloS one* 2016;**11**:e0157360. doi:10.1371/journal.pone.0157360
- 87 Rojas-Serrano J, Pérez LL, García CG, *et al.* Current smoking status is associated to a non-ACR 50 response in early rheumatoid arthritis. A cohort study. *Clinical rheumatology* 2011;**30**:1589–93. doi:10.1007/s10067-011-1775-5
- 88 Toms TE, Symmons DP, Kitas GD. Dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: the role of inflammation, drugs, lifestyle and genetic factors. *Current vascular pharmacology* 2010;**8**:301–26.
- 89 González-Gay MA, González-Juanatey C. Inflammation and lipid profile in rheumatoid arthritis: bridging an apparent paradox. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;**73**:1281–3. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204933
- 90 Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, *et al.* Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2761–7.
- 91 Charles-Schoeman C, Lee YY, Grijalva V, *et al.* Cholesterol efflux by high density lipoproteins is impaired in patients with active rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2012;**71**:1157–62. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200493
- 92 Botta E, Meroño T, Saucedo C, *et al.* Associations between disease activity, markers of HDL functionality and arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2016;**251**:438–44. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.009
- 93 Robertson J, Peters MJ, McInnes IB, *et al.* Changes in lipid levels with inflammation and therapy in RA: a maturing paradigm. *Nature reviews Rheumatology* 2013;**9**:513–23. doi:10.1038/nrrheum.2013.91
- 94 Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, *et al.* Insulin resistance in rheumatoid arthritis: the impact of the anti-TNF-alpha therapy.

- Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;**1193**:153–9.
doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05287.x
- 95 Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine* 2008;**121**:S21-31.
doi:10.1016/j.amjmed.2008.06.014
- 96 Panoulas VF, Toms TE, Metsios GS, *et al.* Target organ damage in patients with rheumatoid arthritis: the role of blood pressure and heart rate. *Atherosclerosis* 2010;**209**:255–60. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.047
- 97 Boyer J-F, Gourraud P-A, Cantagrel A, *et al.* Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2011;**78**:179–83. doi:10.1016/j.jbspin.2010.07.016
- 98 Panoulas VF, Douglas KMJ, Milionis HJ, *et al.* Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2007;**46**:1477–82. doi:10.1093/rheumatology/kem169
- 99 Ronda N, Greco D, Adorni MP, *et al.* Newly identified antiatherosclerotic activity of methotrexate and adalimumab: complementary effects on lipoprotein function and macrophage cholesterol metabolism. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2015;**67**:1155–64. doi:10.1002/art.39039
- 100 Roubille C, Richer V, Starnino T, *et al.* The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;**74**:480–9. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206624
- 101 Goodson NJ, Brookhart AM, Symmons DPM, *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drug use does not appear to be associated with increased cardiovascular mortality in patients with inflammatory polyarthritis: results from a primary care based inception cohort of patients. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;**68**:367–72. doi:10.1136/ard.2007.076760
- 102 Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, *et al.* Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)* 2011;**342**:c7086.
- 103 Lindhardsen J, Gislason GH, Jacobsen S, *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a nationwide cohort study. *Annals of the rheumatic diseases* Published Online

- First: 8 June 2013. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203137
- 104 Marks JL, van der Heijde DM, Colebatch AN, *et al.* Pain pharmacotherapy in patients with inflammatory arthritis and concurrent cardiovascular or renal disease: a Cochrane systematic review. *The Journal of rheumatology Supplement* 2012;**90**:81–4. doi:10.3899/jrheum.120347
- 105 Aviña-Zubieta JA, Abrahamowicz M, De Vera MA, *et al.* Immediate and past cumulative effects of oral glucocorticoids on the risk of acute myocardial infarction in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford, England)* 2013;**52**:68–75. doi:10.1093/rheumatology/kes353
- 106 del Rincón I, Battafarano DF, Restrepo JF, *et al.* Glucocorticoid dose thresholds associated with all-cause and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014;**66**:264–72. doi:10.1002/art.38210
- 107 Listing J, Kekow J, Manger B, *et al.* Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF α inhibitors and rituximab. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;**74**:415–21. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204021
- 108 Peters MJL, Symmons DPM, McCarey D, *et al.* EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;**69**:325–31. doi:10.1136/ard.2009.113696
- 109 Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, *et al.* EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Annals of the rheumatic diseases* 2017;**76**:17–28. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209775
- 110 Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, *et al.* Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *New England Journal of Medicine* 2019;**380**:752–62. doi:10.1056/NEJMoa1809798
- 111 Meyer PW, Anderson R, Ker JA, *et al.* Rheumatoid arthritis and risk of cardiovascular disease. *Cardiovascular journal of Africa* 2018;**29**:1–5. doi:10.5830/CVJA-2018-018
- 112 Benucci M, Bandinelli F, Damiani A, *et al.* Factors correlated with the improvement of endothelial dysfunction during Abatacept therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Inflammation Research* 2018;**Volume 11**:247–52. doi:10.2147/JIR.S156822

- 113 Jin Y, Kang EH, Brill G, *et al.* Cardiovascular (CV) Risk after Initiation of Abatacept versus TNF Inhibitors in Rheumatoid Arthritis Patients with and without Baseline CV Disease. *The Journal of Rheumatology* 2018;jrheum.170926. doi:10.3899/jrheum.170926
- 114 Kim SC, Solomon DH, Rogers JR, *et al.* No difference in cardiovascular risk of tocilizumab versus abatacept for rheumatoid arthritis: A multi-database cohort study. *Seminars in arthritis and rheumatism* Published Online First: 22 March 2018. doi:10.1016/j.semarthrit.2018.03.012
- 115 Stevens RJ, Douglas KMJ, Saratzis AN, *et al.* Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert reviews in molecular medicine* 2005;7:1–24. doi:10.1017/S1462399405009154
- 116 Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2012;51 Suppl 5:v3-11. doi:10.1093/rheumatology/kes113
- 117 Aubry M-C, Maradit-Kremers H, Reinalda MS, *et al.* Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2007;34:937–42.
- 118 Martín-Martínez MA, González-Juanatey C, Castañeda S, *et al.* Recommendations for the management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: scientific evidence and expert opinion. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2014;44:1–8. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.01.002
- 119 Crowson CS, Gabriel SE. Towards improving cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis: the need for accurate risk assessment. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70:719–21. doi:10.1136/ard.2010.145482
- 120 Dessein PH, Semb AG. Could cardiovascular disease risk stratification and management in rheumatoid arthritis be enhanced? *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1743–6. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203911
- 121 Corrales A, González-Juanatey C, Peiró ME, *et al.* Carotid ultrasound is useful for the cardiovascular risk stratification of patients with rheumatoid arthritis: results of a population-based study. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;73:722–7. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203101
- 122 Bonek K, Głuszko P. Cardiovascular risk assessment in rheumatoid arthritis - controversies and the new approach. *Reumatologia* 2016;54:128–35. doi:10.5114/reum.2016.61214

- 123 López-Mejías R, Castañeda S, González-Juanatey C, *et al.* Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers. *Autoimmunity reviews* 2016;**15**:1013–30. doi:10.1016/j.autrev.2016.07.026
- 124 Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Scientific American* 2002;**286**:46–55.
- 125 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;**473**:317–25. doi:10.1038/nature10146
- 126 Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 2003;**14**:421–30. doi:10.1097/01.mol.0000092616.86399.dc
- 127 Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007;**116**:1832–44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- 128 Haver VG, Slart RHJA, Zeebregts CJ, *et al.* Rupture of vulnerable atherosclerotic plaques: microRNAs conducting the orchestra? *Trends in cardiovascular medicine* 2010;**20**:65–71. doi:10.1016/j.tcm.2010.04.002
- 129 Sattar N, McCarey DW, Capell H, *et al.* Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003;**108**:2957–63. doi:10.1161/01.CIR.0000099844.31524.05
- 130 de Groot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R, *et al.* Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 2008;**5**:280–8. doi:10.1038/ncpcardio1163
- 131 Nambi V, Chambless L, He M, *et al.* Common carotid artery intima-media thickness is as good as carotid intima-media thickness of all carotid artery segments in improving prediction of coronary heart disease risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *European heart journal* 2012;**33**:183–90. doi:10.1093/eurheartj/ehr192
- 132 Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2013;**34**:2159–219. doi:10.1093/eurheartj/eh151

- 133 Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, *et al.* Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thrombosis and haemostasis* 2015;**113**:916–30. doi:10.1160/TH14-11-0921
- 134 Scarno A, Perrotta FM, Cardini F, *et al.* Beyond the joint: Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *World journal of orthopedics* 2014;**5**:328–35. doi:10.5312/wjo.v5.i3.328
- 135 Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, *et al.* Carotid intima-media thickness predicts the development of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2009;**38**:366–71. doi:10.1016/j.semarthrit.2008.01.012
- 136 Carotti M, Salaffi F, Mangiacotti M, *et al.* [Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: the role of high-resolution B mode ultrasound in the measurement of the arterial intima-media thickness]. *Reumatismo*; **59**:38–49.
- 137 Mohan A, Sada S, Kumar BS, *et al.* Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis by utilizing carotid intima-media thickness as a surrogate marker. *The Indian journal of medical research* 2014;**140**:379–86.
- 138 Semb AG, Ikdahl E, Hisdal J, *et al.* Exploring cardiovascular disease risk evaluation in patients with inflammatory joint diseases. *International journal of cardiology* 2016;**223**:331–6. doi:10.1016/j.ijcard.2016.08.129
- 139 van Breukelen-van der Stoep DF, van Zeben D, Klop B, *et al.* Association of Cardiovascular Risk Factors with Carotid Intima Media Thickness in Patients with Rheumatoid Arthritis with Low Disease Activity Compared to Controls: A Cross-Sectional Study. *PloS one* 2015;**10**:e0140844. doi:10.1371/journal.pone.0140844
- 140 García Díaz J de D, López de Guzmán A, Díez-Pérez de la Vacas MI, *et al.* [Determinants of carotid subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A case-control study]. *Medicina clínica* 2008;**130**:210–2.
- 141 van Sijl AM, Peters MJ, Knol DK, *et al.* Carotid intima media thickness in rheumatoid arthritis as compared to control subjects: a meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2011;**40**:389–97. doi:10.1016/j.semarthrit.2010.06.006
- 142 Ristić GG, Lepić T, Glisić B, *et al.* Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness: impact of anti-inflammatory treatment. *Rheumatology (Oxford, England)* 2010;**49**:1076–81. doi:10.1093/rheumatology/kep456

- 143 Evans MR, Escalante A, Battafarano DF, *et al.* Carotid atherosclerosis predicts incident acute coronary syndromes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2011;**63**:1211–20. doi:10.1002/art.30265
- 144 Im CH, Kim NR, Kang JW, *et al.* Inflammatory burden interacts with conventional cardiovascular risk factors for carotid plaque formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2015;**54**:808–15. doi:10.1093/rheumatology/keu376
- 145 Södergren A, Karp K, Boman K, *et al.* Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis research & therapy* 2010;**12**:R158. doi:10.1186/ar3116
- 146 Mahajan V, Handa R, Kumar U, *et al.* Assessment of atherosclerosis by carotid intimomedial thickness in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2008;**56**:587–90.
- 147 del Rincón I, Williams K, Stern MP, *et al.* Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis & Rheumatism* 2003;**48**:1833–40. doi:10.1002/art.11078
- 148 Cavagna L, Boffini N, Cagnotto G, *et al.* Atherosclerosis and rheumatoid arthritis: more than a simple association. *Mediators of inflammation* 2012;**2012**:147354. doi:10.1155/2012/147354
- 149 Del Rincón I, O’Leary DH, Freeman GL, *et al.* Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;**195**:354–60. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.09.027
- 150 Kumeda Y, Inaba M, Goto H, *et al.* Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;**46**:1489–97. doi:10.1002/art.10269
- 151 Grover S, Sinha RP, Singh U, *et al.* Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis in India. *The Journal of rheumatology* 2006;**33**:244–7.
- 152 Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, *et al.* Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine* 2003;**82**:407–13. doi:10.1097/01.md.0000101572.76273.60
- 153 Tanasescu C, Jurcut C, Jurcut R, *et al.* Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. *European journal of internal*

- medicine* 2009;**20**:348–54. doi:10.1016/j.ejim.2008.09.005
- 154 van den Oever IAM, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 2013;**5**:166–81. doi:10.1177/1759720X13491025
- 155 Arts EEA, Fransen J, den Broeder AA, *et al.* The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;**74**:998–1003. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204531
- 156 Lee JH, Cho KI, Kim SM. Carotid arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis assessed by speckle tracking strain imaging: its association with carotid atherosclerosis. *Clinical and experimental rheumatology* 2012;**30**:720–8.
- 157 Wong M, Toh L, Wilson A, *et al.* Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:81–9. doi:10.1002/art.10748
- 158 Kocabay G, Hasdemir H, Yildiz M. Evaluation of pulse wave velocity in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Behçet’s disease. *Journal of cardiology* 2012;**59**:72–7. doi:10.1016/j.jjcc.2011.09.004
- 159 Provan SA, Angel K, Semb AG, *et al.* Early prediction of increased arterial stiffness in patients with chronic inflammation: a 15-year followup study of 108 patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2011;**38**:606–12. doi:10.3899/jrheum.100689
- 160 Ikdahl E, Rollefstad S, Wibetoe G, *et al.* Predictive Value of Arterial Stiffness and Subclinical Carotid Atherosclerosis for Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology* 2016;**43**:1622–30. doi:10.3899/jrheum.160053
- 161 Nelson SS, Khan AK. To Study Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2015;**63**:26–30.
- 162 Dzieza-Grudnik A, Sulicka J, Strach M, *et al.* Arterial stiffness is not increased in patients with short duration rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Blood pressure* 2016;:1–7. doi:10.1080/08037051.2016.1232586
- 163 Ahmed HMMS, Youssef M, Mosaad YM. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein are associated with subclinical atherosclerosis in recent-onset rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* 2010;**29**:1237–43.

- doi:10.1007/s10067-010-1436-0
- 164 Hannawi S, Haluska B, Marwick TH, *et al.* Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation. *Arthritis research & therapy* 2007;**9**:R116. doi:10.1186/ar2323
- 165 Ajeganova S, de Faire U, Jogestrand T, *et al.* Carotid atherosclerosis, disease measures, oxidized low-density lipoproteins, and atheroprotective natural antibodies for cardiovascular disease in early rheumatoid arthritis -- an inception cohort study. *The Journal of rheumatology* 2012;**39**:1146–54. doi:10.3899/jrheum.111334
- 166 Vázquez-Del Mercado M, Nuñez-Atahualpa L, Figueroa-Sánchez M, *et al.* Serum levels of anticyclic citrullinated peptide antibodies, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and C-reactive protein are associated with increased carotid intima-media thickness: a cross-sectional analysis of a cohort of rheumatoid arthritis patien. *BioMed research international* 2015;**2015**:342649. doi:10.1155/2015/342649
- 167 Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Piñeiro A, *et al.* High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2005;**32**:1219–23.
- 168 Gerli R, Bartoloni Bocci E, Sherer Y, *et al.* Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies with subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2008;**67**:724–5. doi:10.1136/ard.2007.073718
- 169 Barbarroja N, Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limon P, *et al.* Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;**34**:2706–16. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304475
- 170 Targońska-Stepniak B, Drelich-Zbroja A, Majdan M. The relationship between carotid intima-media thickness and the activity of rheumatoid arthritis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 2011;**17**:249–55. doi:10.1097/RHU.0b013e3182290dbf
- 171 Jonsson SW, Backman C, Johnson O, *et al.* Increased prevalence of atherosclerosis in patients with medium term rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2001;**28**:2597–602.
- 172 Pereira IA, Laurindo IMM, Zimmermann AF, *et al.* Single measurements of C-

- reactive protein and disease activity scores are not predictors of carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients. *Acta reumatológica portuguesa*;34:58–64.
- 173 El-Barbary AM, Kassem EM, El-Sergany MAS, *et al.* Association of anti-modified citrullinated vimentin with subclinical atherosclerosis in early rheumatoid arthritis compared with anti-cyclic citrullinated peptide. *The Journal of rheumatology* 2011;38:828–34. doi:10.3899/jrheum.101143
- 174 Sung JH, Lee JE, Samdarshi TE, *et al.* C-reactive protein and subclinical cardiovascular disease among African-Americans: (the Jackson Heart Study). *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md)* 2014;15:371–6. doi:10.2459/JCM.0b013e32836411d6
- 175 Sandoo A, Chanchlani N, Hodson J, *et al.* Classical cardiovascular disease risk factors associate with vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a six-year prospective study. *Arthritis research & therapy* 2013;15:R203. doi:10.1186/ar4396
- 176 Corrales A, Dessein PH, Tsang L, *et al.* Carotid artery plaque in women with rheumatoid arthritis and low estimated cardiovascular disease risk: a cross-sectional study. *Arthritis research & therapy* 2015;17:55. doi:10.1186/s13075-015-0576-7
- 177 Södergren A, Karp K, Bengtsson C, *et al.* The Extent of Subclinical Atherosclerosis Is Partially Predicted by the Inflammatory Load: A Prospective Study over 5 Years in Patients with Rheumatoid Arthritis and Matched Controls. *The Journal of rheumatology* 2015;42:935–42. doi:10.3899/jrheum.140694
- 178 Akrouf R, Fourati H, Mnif E, *et al.* [Increased cardiovascular risk and premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis]. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 2012;61:267–73. doi:10.1016/j.ancard.2012.04.009
- 179 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- 180 Rajewsky N, Succi ND. Computational identification of microRNA targets. *Developmental biology* 2004;267:529–35. doi:10.1016/j.ydbio.2003.12.003
- 181 Islas J, Moreno-Cuevas J. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:2075. doi:10.3390/ijms19072075
- 182 Furer V, Greenberg JD, Attur M, *et al.* The role of microRNA in rheumatoid

- arthritis and other autoimmune diseases. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2010;**136**:1–15. doi:10.1016/j.clim.2010.02.005
- 183 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;**136**:26–36. doi:10.1016/j.cell.2008.12.027
- 184 Islas J, Moreno-Cuevas J. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;**19**:2075. doi:10.3390/ijms19072075
- 185 Tavasolian F, Abdollahi E, Rezaei R, *et al.* Altered Expression of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Cellular Biochemistry* 2018;**119**:478–87. doi:10.1002/jcb.26205
- 186 Moran-Moguel MC, Petarra-Del Rio S, Mayorquin-Galvan EE, *et al.* Rheumatoid Arthritis and miRNAs: A Critical Review through a Functional View. *Journal of immunology research* 2018;**2018**:2474529. doi:10.1155/2018/2474529
- 187 Kwekkeboom RFJ, Lei Z, Doevendans PA, *et al.* Targeted delivery of miRNA therapeutics for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Clinical Science* 2014;**127**:351–65. doi:10.1042/CS20140005
- 188 Pauley KM, Satoh M, Chan AL, *et al.* Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis research & therapy* 2008;**10**:R101. doi:10.1186/ar2493
- 189 Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD, *et al.* miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Human Immunology* 2010;**71**:206–11. doi:10.1016/j.humimm.2009.11.008
- 190 Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, *et al.* Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 2010;**12**:R86. doi:10.1186/ar3013
- 191 Murata K, Furu M, Yoshitomi H, *et al.* Comprehensive microRNA Analysis Identifies miR-24 and miR-125a-5p as Plasma Biomarkers for Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 2013;**8**:e69118. doi:10.1371/journal.pone.0069118
- 192 Anaparti V, Smolik I, Meng X, *et al.* Whole blood microRNA expression pattern differentiates patients with rheumatoid arthritis, their seropositive first-degree relatives, and healthy unrelated control subjects. *Arthritis Research & Therapy* 2017;**19**:249. doi:10.1186/s13075-017-1459-x
- 193 Ouboussad L, Hunt L, Hensor EMA, *et al.* Profiling microRNAs in individuals at

- risk of progression to rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2017;**19**:288. doi:10.1186/s13075-017-1492-9
- 194 Zhu W, Yu J, Qiu S, *et al.* MiR-let-7a regulates anti-citrullinated protein antibody-induced macrophage activation and correlates with the development of experimental rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology* 2017;**51**:40–6. doi:10.1016/j.intimp.2017.08.001
- 195 Dudics S, Venkatesha SH, Moudgil KD. The Micro-RNA Expression Profiles of Autoimmune Arthritis Reveal Novel Biomarkers of the Disease and Therapeutic Response. *International journal of molecular sciences* 2018;**19**:2293. doi:10.3390/ijms19082293
- 196 Wu J, Fan W, Ma L, *et al.* miR-708-5p promotes fibroblast-like synoviocytes' cell apoptosis and ameliorates rheumatoid arthritis by the inhibition of Wnt3a/ β -catenin pathway. *Drug design, development and therapy* 2018;**12**:3439–47. doi:10.2147/DDDT.S177128
- 197 Zhang B, Wang L-S, Zhou Y-H. Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF- κ B pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;**93**:1151–7. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.042
- 198 Hussain N, Zhu W, Jiang C, *et al.* Down-regulation of miR-10a-5p in synoviocytes contributes to TBX5-controlled joint inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2018;**22**:241–50. doi:10.1111/jcmm.13312
- 199 Shi D-L, Shi G-R, Xie J, *et al.* MicroRNA-27a Inhibits Cell Migration and Invasion of Fibroblast-Like Synoviocytes by Targeting Follistatin-Like Protein 1 in Rheumatoid Arthritis. *Molecules and cells* 2016;**39**:611–8. doi:10.14348/molcells.2016.0103
- 200 Lin J, Huo R, Xiao L, *et al.* A novel p53/microRNA-22/Cyr61 axis in synovial cells regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014;**66**:49–59. doi:10.1002/art.38142
- 201 Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, *et al.* MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**60**:1294–304. doi:10.1002/art.24475
- 202 Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, *et al.* MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in

- fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**60**:1294–304. doi:10.1002/art.24475
- 203 Zhou Q, Long L, Zhou T, *et al.* Demethylation of MicroRNA-124a Genes Attenuated Proliferation of Rheumatoid Arthritis Derived Fibroblast-Like Synoviocytes and Synthesis of Tumor Necrosis Factor- α . *PLOS ONE* 2016;**11**:e0164207. doi:10.1371/journal.pone.0164207
- 204 Li S, Jin Z, Lu X. MicroRNA-192 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by downregulating caveolin 1. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2017;**432**:123–30. doi:10.1007/s11010-017-3003-3
- 205 Liu J, Fei D, Xing J, *et al.* MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;**96**:173–81. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.120
- 206 Nagata Y, Nakasa T, Mochizuki Y, *et al.* Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded MicroRNA-15a. *Arthritis and rheumatism* 2009;**60**:2677–83. doi:10.1002/art.24762
- 207 Castro-Villegas C, Pérez-Sánchez C, Escudero A, *et al.* Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF α . *Arthritis Research & Therapy* 2015;**17**:49. doi:10.1186/s13075-015-0555-z
- 208 Filková M, Aradi B, Senolt L, *et al.* Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;**73**:1898–904. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202815
- 209 Singh A, Patro PS, Aggarwal A. MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* Published Online First: 3 December 2018. doi:10.1007/s10067-018-4380-z
- 210 Zheng Y, Xiong S, Jiang P, *et al.* Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by downregulating microRNA-155: a novel anti-inflammation mechanism. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;**52**:1307–17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.031
- 211 Hruskova V, Jandova R, Vernerova L, *et al.* MicroRNA-125b: association with

- disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2016;**18**:124. doi:10.1186/s13075-016-1023-0
- 212 Sode J, Krintel SB, Carlsen AL, *et al.* Plasma MicroRNA Profiles in Patients with Early Rheumatoid Arthritis Responding to Adalimumab plus Methotrexate vs Methotrexate Alone: A Placebo-controlled Clinical Trial. *The Journal of rheumatology* 2018;**45**:53–61. doi:10.3899/jrheum.170266
- 213 Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, *et al.* MicroRNA Expression Analysis of Centenarians and Rheumatoid Arthritis Patients Reveals a Common Expression Pattern. *International journal of medical sciences* 2017;**14**:622–8. doi:10.7150/ijms.18972
- 214 Bae S-C, Lee YH. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2018;**21**:1335–42. doi:10.1111/1756-185X.13338
- 215 Feng Z, Li J, Ren J, *et al.* [Expression of miR-146a and miR-16 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis and their correlation to the disease activity]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 2011;**31**:320–3.
- 216 Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, *et al.* Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes & Immunity* 2014;**15**:115–25. doi:10.1038/gene.2013.69
- 217 Ji R, Cheng Y, Yue J, *et al.* MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation research* 2007;**100**:1579–88. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.141986
- 218 Cheng Y, Liu X, Yang J, *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation research* 2009;**105**:158–66. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197517
- 219 Small EM, Frost RJA, Olson EN. MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. *Circulation* 2010;**121**:1022–32. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.889048
- 220 Fish JE, Santoro MM, Morton SU, *et al.* miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell* 2008;**15**:272–84.

- doi:10.1016/j.devcel.2008.07.008
- 221 Dews M, Homayouni A, Yu D, *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature genetics* 2006;**38**:1060–5.
doi:10.1038/ng1855
- 222 Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, *et al.* Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circulation research* 2007;**101**:59–68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.153916
- 223 Zhang C. MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2009;**8**:3469–73. doi:10.4161/cc.8.21.9837
- 224 Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, *et al.* MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable Coronary Artery Disease Patients. *PLOS ONE* 2015;**10**:e0140958.
doi:10.1371/journal.pone.0140958
- 225 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, *et al.* MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology* 2011;**13**:423–33. doi:10.1038/ncb2210
- 226 Wagner J, Riwanto M, Besler C, *et al.* Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013;**33**:1392–400.
doi:10.1161/ATVBAHA.112.300741
- 227 Michell DL, Vickers KC. HDL and microRNA therapeutics in cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics* 2016;**168**:43–52.
doi:10.1016/j.pharmthera.2016.09.001
- 228 Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, *et al.* HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature Communications* 2014;**5**:3292. doi:10.1038/ncomms4292
- 229 Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, *et al.* MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* 2015;**101**:921–8.
doi:10.1136/heartjnl-2013-305402
- 230 Schulte C, Zeller T. microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts. *Cardiovascular diagnosis and therapy* 2015;**5**:17–36. doi:10.3978/j.issn.2223-3652.2014.12.03
- 231 Sun L-L, Li W-D, Lei F-R, *et al.* The regulatory role of microRNAs in

- angiogenesis-related diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2018;**22**:4568–87. doi:10.1111/jcmm.13700
- 232 Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS Letters* 2018;**592**:2884–900. doi:10.1002/1873-3468.13182
- 233 Qin J, Liang H, Shi D, *et al.* A panel of microRNAs as a new biomarkers for the detection of deep vein thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2015;**39**:215–21. doi:10.1007/s11239-014-1131-0
- 234 Hoekstra M, van der Lans CAC, Halvorsen B, *et al.* The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;**394**:792–7. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.075
- 235 Jansen F, Schäfer L, Wang H, *et al.* Kinetics of Circulating MicroRNAs in Response to Cardiac Stress in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American Heart Association* 2017;**6**. doi:10.1161/JAHA.116.005270
- 236 Maitrias P, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, *et al.* MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque. *Journal of Vascular Surgery* 2015;**62**:1245–1250.e1. doi:10.1016/j.jvs.2015.06.136
- 237 Tana C, Giamberardino MA, Cipollone F. microRNA profiling in atherosclerosis, diabetes, and migraine. *Annals of Medicine* 2017;**49**:93–105. doi:10.1080/07853890.2016.1226515
- 238 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* Published Online First: 5 July 2009. doi:10.1038/nature08195
- 239 Codagnone M, Recchiuti A, Lanuti P, *et al.* Lipoxin A4 stimulates endothelial miR-126-5p expression and its transfer via microvesicles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2017;**31**:1856–66. doi:10.1096/fj.201600952R
- 240 Boon RA, Dimmeler S. MicroRNA-126 in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;**34**:e15-6. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303572
- 241 Nanoudis S, Pikilidou M, Yavropoulou M, *et al.* The Role of MicroRNAs in Arterial Stiffness and Arterial Calcification. An Update and Review of the Literature. *Frontiers in Genetics* 2017;**8**. doi:10.3389/fgene.2017.00209
- 242 Mohajeri M, Banach M, Atkin SL, *et al.* MicroRNAs: Novel Molecular Targets

- and Response Modulators of Statin Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 2018;**39**:967–81. doi:10.1016/j.tips.2018.09.005
- 243 Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, *et al.* Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2011;**121**:2921–31. doi:10.1172/JCI57275
- 244 Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, *et al.* Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 2011;**478**:404–7. doi:10.1038/nature10486
- 245 Krishnan R, Mani P, Sivakumar P, *et al.* Expression and methylation of circulating microRNA-510 in essential hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2017;**40**:361–3. doi:10.1038/hr.2016.147
- 246 Kaneto CM, Nascimento JS, Moreira MCR, *et al.* MicroRNA profiling identifies miR-7-5p and miR-26b-5p as differentially expressed in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017;**50**. doi:10.1590/1414-431x20176211
- 247 Huang Y-Q, Huang C, Chen J-Y, *et al.* Plasma expression level of miRNA let-7 is positively correlated with carotid intima-media thickness in patients with essential hypertension. *Journal of human hypertension* 2017;**31**:843–7. doi:10.1038/jhh.2017.52
- 248 Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, *et al.* MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage. *Journal of the American Society of Hypertension* 2014;**8**:368–75. doi:10.1016/j.jash.2014.03.324
- 249 Wang K, Long B, Zhou J, *et al.* miR-9 and NFATc3 Regulate Myocardin in Cardiac Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2010;**285**:11903–12. doi:10.1074/jbc.M109.098004
- 250 Shiuchi T, Cui T-X, Wu L, *et al.* ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2002;**40**:329–34.
- 251 Wang Y, Jin L. miRNA-145 is associated with spontaneous hypertension by targeting SLC7A1. *Experimental and therapeutic medicine* 2018;**15**:548–52. doi:10.3892/etm.2017.5371
- 252 Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T, *et al.* Circulating microRNA: a novel potential

- biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal* 2010;**31**:659–66. doi:10.1093/eurheartj/ehq013
- 253 Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, *et al.* Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research* 2010;**107**:677–84. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215566
- 254 Sun T, Dong Y-H, Du W, *et al.* The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application. *International journal of molecular sciences* 2017;**18**:745. doi:10.3390/ijms18040745
- 255 Parizadeh SM, Ferns GA, Ghandehari M, *et al.* The diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in coronary artery disease: A novel approach to disease diagnosis of stable CAD and acute coronary syndrome. *Journal of Cellular Physiology* 2018;**233**:6418–24. doi:10.1002/jcp.26324
- 256 Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, *et al.* MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* 2011;**124**:720–30. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039008
- 257 Li C, Chen X, Huang J, *et al.* Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *European journal of medical research* 2015;**20**:58. doi:10.1186/s40001-015-0148-y
- 258 van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;**105**:13027–32. doi:10.1073/pnas.0805038105
- 259 Liu X, Xu Y, Deng Y, *et al.* MicroRNA-223 Regulates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Targeting RASA1. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2018;**46**:1439–54. doi:10.1159/000489185
- 260 Wong L, Wang J, Liew O, *et al.* MicroRNA and Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;**17**:502. doi:10.3390/ijms17040502
- 261 Sermersheim MA, Park KH, Gumpfer K, *et al.* MicroRNA regulation of autophagy in cardiovascular disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2017;**22**:48–65.
- 262 Cai W-F, Liu G-S, Lam CK, *et al.* Up-regulation of micro-RNA765 in human failing hearts is associated with post-transcriptional regulation of protein phosphatase inhibitor-1 and depressed contractility. *European journal of heart*

- failure* 2015;**17**:782–93. doi:10.1002/ejhf.323
- 263 Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Muñoz A, *et al.* Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature* 2014;**508**:531–5. doi:10.1038/nature13073
- 264 Xu M, Wu H-D, Li R-C, *et al.* Mir-24 regulates junctophilin-2 expression in cardiomyocytes. *Circulation research* 2012;**111**:837–41. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.277418
- 265 Melman YF, Shah R, Danielson K, *et al.* Circulating MicroRNA-30d Is Associated With Response to Cardiac Resynchronization Therapy in Heart Failure and Regulates Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation* 2015;**131**:2202–16. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013220
- 266 Potus F, Ruffenach G, Dahou A, *et al.* Downregulation of MicroRNA-126 Contributes to the Failing Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2015;**132**:932–43. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016382
- 267 Wang Y, Jin L. miRNA-145 is associated with spontaneous hypertension by targeting SLC7A1. *Experimental and Therapeutic Medicine* Published Online First: 24 October 2017. doi:10.3892/etm.2017.5371
- 268 Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2016;**68**:2577–84. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.945
- 269 Huang F, Li M-L, Fang Z-F, *et al.* Overexpression of MicroRNA-1 Improves the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Transplantation after Myocardial Infarction. *Cardiology* 2013;**125**:18–30. doi:10.1159/000347081
- 270 Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *Journal of the American College of Cardiology* 2014;**63**:2177–87. doi:10.1016/j.jacc.2014.01.050
- 271 Faccini J, Ruidavets J-B, Cordelier P, *et al.* Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Scientific Reports* 2017;**7**:42916. doi:10.1038/srep42916
- 272 Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism* 2012;**64**:11–20. doi:10.1002/art.30651
- 273 Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, *et al.* MicroRNAs and Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 2013;**15**:322. doi:10.1007/s11883-013-0322-z

- 274 Ormseth MJ, Solus JF, Vickers KC, *et al.* Utility of Select Plasma MicroRNA for Disease and Cardiovascular Risk Assessment in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2015;**42**:1746–51.
doi:10.3899/jrheum.150232
- 275 López-Pedreira C, Pérez-Sánchez C, Ramos-Casals M, *et al.* Cardiovascular Risk in Systemic Autoimmune Diseases: Epigenetic Mechanisms of Immune Regulatory Functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012;**2012**:1–10.
doi:10.1155/2012/974648
- 276 Guo M, Mao X, Ji Q, *et al.* miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. *Immunology and cell biology* 2010;**88**:555–64. doi:10.1038/icb.2010.16
- 277 Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, *et al.* Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis and rheumatism* 2003;**48**:54–8. doi:10.1002/art.10705
- 278 Castro AM, Carmona-Fernandes D, Rodrigues AM, *et al.* Incidence and predictors of cardiovascular events in a cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Acta reumatologica portuguesa*; **41**:213–9.
- 279 del Rincón ID, Williams K, Stern MP, *et al.* High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2737–45.
- 280 Ambrosino P, Tasso M, Lupoli R, *et al.* Non-invasive assessment of arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of literature studies. *Annals of medicine* 2015;**47**:457–67.
doi:10.3109/07853890.2015.1068950
- 281 Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, *et al.* MicroRNAs and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* 2013;**15**:322. doi:10.1007/s11883-013-0322-z
- 282 Paredes S, Taverner D, Ferré R, *et al.* MicroRNA differential expression shared between rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction: an exploratory study. *Clinical and experimental rheumatology* 2019.
- 283 López-Pedreira C, Pérez-Sánchez C, Ramos-Casals M, *et al.* Cardiovascular risk in systemic autoimmune diseases: epigenetic mechanisms of immune regulatory functions. *Clinical & developmental immunology* 2012;**2012**:974648.
doi:10.1155/2012/974648
- 284 Wang L, Liu J, Xu B, *et al.* Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the

- plasma represents the progression of fibrosis and heart failure. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 2018;**34**:626–33. doi:10.1016/j.kjms.2018.05.008
- 285 Souza RWA, Fernandez GJ, Cunha JPQ, *et al.* Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2015;**309**:H1629-41. doi:10.1152/ajpheart.00941.2014
- 286 Zhang J, Ren J, Chen H, *et al.* [Statins decreases expression of five inflammation-associated microRNAs in the plasma of patients with unstable angina]. *Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences* 2015;**47**:761–8.
- 287 Murata K, Yoshitomi H, Furu M, *et al.* MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014;**66**:549–59. doi:10.1002/art.38269
- 288 Vlachopoulos C, Aznaouridis K, O'Rourke MF, *et al.* Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal* 2010;**31**:1865–71. doi:10.1093/eurheartj/ehq024
- 289 Ahlmén M, Svensson B, Albertsson K, *et al.* Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;**69**:230–3. doi:10.1136/ard.2008.102244
- 290 Peters SAE, Muntner P, Woodward M. Sex Differences in the Prevalence of, and Trends in, Cardiovascular Risk Factors, Treatment, and Control in the United States, 2001 to 2016. *Circulation* 2019;**139**:1025–35. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035550
- 291 Sokka T, Toloza S, Cutolo M, *et al.* Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy* 2009;**11**:R7. doi:10.1186/ar2591
- 292 Carlsten H. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunological Reviews* 2005;**208**:194–206. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00326.x
- 293 D'Elia HF, Larsen A, Mattsson L-A, *et al.* Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2003;**30**:1456–63.

- 294 Liao L-J, Cho T-Y, Huang T-W. Assessment of carotid artery intima-media thickness in patients with obstructive sleep apnoea. *Clinical Otolaryngology* Published Online First: 4 January 2017. doi:10.1111/coa.12823
- 295 Howard G, Sharrett AR, Heiss G, *et al.* Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke* 1993;**24**:1297–304.
- 296 Şirin Özcan AN, Aslan AN, Ünal Ö, *et al.* A novel ultrasound-based technique to establish a correlation between disease activity and local carotid stiffness parameters in rheumatoid arthritis. *Medical ultrasonography* 2017;**19**:288–94.
- 297 Aslan AN, Şirin Özcan AN, Erten Ş, *et al.* Assessment of local carotid stiffness in seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 2017;**51**:255–60. doi:10.1080/14017431.2017.1343493
- 298 Kim Y-S, Sung Y-K, Choi C-B, *et al.* The major determinants of arterial stiffness in Korean patients with rheumatoid arthritis are age and systolic blood pressure, not disease-related factors. *Rheumatology International* 2012;**32**:3455–61. doi:10.1007/s00296-011-2198-y
- 299 Kim Y-S, Sung Y-K, Choi C-B, *et al.* The major determinants of arterial stiffness in Korean patients with rheumatoid arthritis are age and systolic blood pressure, not disease-related factors. *Rheumatology international* 2012;**32**:3455–61. doi:10.1007/s00296-011-2198-y
- 300 Khordadmehr M, Jigari-Asl F, Ezzati H, *et al.* A comprehensive review on miR-451: A promising cancer biomarker with therapeutic potential. *Journal of cellular physiology* 2019;;jcp.28888. doi:10.1002/jcp.28888
- 301 Zhang J, Shi J, Zhang G, *et al.* MicroRNA-425 upregulation indicates better prognosis in younger acute myeloid leukemia patients undergoing chemotherapy. *Oncology Letters* 2019;**17**:5793–802. doi:10.3892/ol.2019.10217
- 302 Souza RWA, Fernandez GJ, Cunha JPQ, *et al.* Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2015;**309**:H1629–41. doi:10.1152/ajpheart.00941.2014
- 303 Song L, Su M, Wang S, *et al.* MiR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *Journal of cellular and molecular medicine* 2014;**18**:2266–74. doi:10.1111/jcmm.12380
- 304 Wang Z-C, Lu H, Zhou Q, *et al.* MiR-451 inhibits synovial fibroblasts

- proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;**8**:14562–7.
- 305 Filková M, Aradi B, Šenolt L, *et al.* Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014;**73**:1898–904. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202815
- 306 Taverner D, Vallvé J-C, Ferré R, *et al.* Variables associated with subclinical atherosclerosis in a cohort of rheumatoid arthritis patients: Sex-specific associations and differential effects of disease activity and age. *PLOS ONE* 2018;**13**:e0193690. doi:10.1371/journal.pone.0193690
- 307 Zampeli E, Protogerou A, Stamatelopoulos K, *et al.* Predictors of new atherosclerotic carotid plaque development in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Arthritis research & therapy* 2012;**14**:R44. doi:10.1186/ar3757
- 308 Cuomo G, Di Micco P, Niglio A, *et al.* [Atherosclerosis and rheumatoid arthritis: relationships between intima-media thickness of the common carotid arteries and disease activity and disability]. *Reumatismo*; **56**:242–6.
- 309 Ristić GG, Lepić T, Glisić B, *et al.* Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness: impact of anti-inflammatory treatment. *Rheumatology (Oxford, England)* 2010;**49**:1076–81. doi:10.1093/rheumatology/kep456
- 310 Şirin Özcan AN, Aslan AN, Ünal Ö, *et al.* A novel ultrasound-based technique to establish a correlation between disease activity and local carotid stiffness parameters in rheumatoid arthritis. *Medical Ultrasonography* 2017;**19**:288. doi:10.11152/mu-949
- 311 Tutoğlu A, Boyacı A, Boyacı N, *et al.* Is There Any Relationship between Joint Destruction and Carotid Intima-media Thickness in Patients with Rheumatoid Arthritis? *Journal of physical therapy science* 2014;**26**:1093–6. doi:10.1589/jpts.26.1093
- 312 Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, *et al.* Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis and rheumatism* 2001;**44**:2761–7.
- 313 Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from

noninvasive pressure waveforms. *American journal of hypertension* 2005;**18**:3S–10S. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.10.009

ABREVIATURAS

ACPA- Anticuerpos péptido cíclico citrulinados
ACV- Enfermedad cerebrovascular
ADN- Ácido desoxirribonucleico
AINES- Antiinflamatorios no esteroideos
Aix- Augmentation index / índice de aumento
Apo-B/apo-A1- Apolipoproteína B/ apolipoproteína A1
AR- Artritis Reumatoide
ARNm- Ácido ribonucleico mensajero
BNP- Péptido natriurético auricular tipo B
CE- Células endoteliales
CML- Células musculares lisas
CMSP- Células mononucleares de sangre periférica
CT- Colesterol total
DAS28- Disease activity score o índice de actividad de la enfermedad
ECV- Enfermedad cardiovascular
EPI- Enfermedad pulmonar intersticial
EPOC- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EULAR- Liga Europea contra las enfermedades reumáticas
FAMES- Fármacos modificadores de la enfermedad
FR- Factor Reumatoide
FS- Fibroblastos sinoviales
GIMc- Grosor íntima-media carotídea
HDL- Lipoproteína de alta densidad
HTA- Hipertensión arterial
IAM- Infarto agudo de miocardio
ICC- Insuficiencia cardíaca congestiva
IL-1- Interleuquina 1
IL-6- Interleuquina 6
LDL- Lipoproteínas de baja densidad
LES- Lupus Eritematoso Sistémico
LT- Linfocitos T
MicroRNA- miRNA o miRs
NAD- Número de articulaciones dolorosas
NAT- Número de articulaciones tumefactas

OA- Osteoartritis

OR- Odds ratio

PAD- Presión arterial diastólica

PAS- Presión arterial sistólica

PCR- Proteína C-reactiva

PLA2- Fosfolipasa A2

PWV- Velocidad de la onda de pulso o pulse wave velocity

RR- Riesgo relativo

SCA- Síndrome coronario agudo

SCOREm- SCORE modificado

TBC- Tuberculosis

TMS- Tasa de mortalidad estandarizada

TNF- α - Factor de necrosis tumoral alfa

TGs- Triglicéridos

VSG- Velocidad de sedimentación globular