



# Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina  
Departament de Medicina  
2013

## **Avances clínicos e inmunológicos en la respuesta al tratamiento con terapia deplectora de linfocitos B (Rituximab<sup>®</sup>) en pacientes con artritis reumatoide**

**Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor en Medicina**

**Directores: Dr. Jordi Casademont Pou  
Dra. Silvia Vidal Alcoriza  
Dr. César Díaz López**

**Doctorando: Cèsar Díaz Torné**



*"Associate with the talented,  
take risks but have a fallback plan,  
have fun and stay connected"*

James D. Watson

*"And in the end, the love you make  
is equal to the love you take"*

The Beatles

La realització d'una tesi doctoral és molt més que una feina personal. Es tracta d'una tasca col·lectiva, on sense l'ajuda i col·laboració de moltes persones la feina no surt ni bé ni tira endavant. A totes aquestes persones, gràcies.

Gràcies en especial a la Silvia, per guiar-me, per aconseguir que la immuno no fos tan difícil i que inclús fos divertida. Gràcies per totes les hores dedicades, fora d'horari i de lloc i per tenir el telèfon sempre a punt. Només em sap greu que no haguem pogut discutir més, però crec que a pesar de tot ens n'hem sortit prou bé.

Gràcies al Jordi, per la seva direcció, per fer fàcils les coses difícils i per tenir sempre una resposta clara i senzilla. Gràcies per encarregar-te i permetre que tot això hagi tirat endavant i arribat a bon port.

Gracias 'papi'. Siempre intentaste que fuéramos más allá y que nos preguntáramos el ¿por qué? Aquí hemos contestado unos cuantos porqués, no muchos, pero en menos de ocho años!! Gracias por tus ánimos, tu apoyo y tu conocimiento sin límites.

Gràcies als amics de la unitat de reumatologia de Sant Pau, pels ànims i l'ajuda en la part clínica. Especialment gràcies Carme, pels consells i el que m'has ensenyat. Gracias Ivan pels ànims i la confiança, i a la Pati, Josep Maria, les residents i tota la resta, per estar al meu costat. Gracias Moni por todo lo que has trabajado con los niveles de rituxi.

Gràcies a la Maria Àngels, Carles, Bet, Mònica... i a tots els d'immuno per aconseguir que gaudis baixant al laboratori i que em sentís com a casa. Gràcies al 'Rodri' i al Cándido per deixar-me venir a molestar-vos i per tot el que m'heu ensenyat.

Gràcies al personal d'hospital de dia, per fer que primer els dimecres i després els dijous sempre comencessin bé, per trobar sempre un forat i per posar sempre bona cara.

Gràcies als de Bellvitge, on tot va començar, gràcies a la Carme i al Joan Miquel per posar-s'hi ben al principi, després tot va seguir altres camins, però vostra és la primera llavor. Gràcies també al jefe Valverde, al Jesús, Xavi i Javi i a les meves Residents grans i Residents petits, per tot el que em vareu ensenyar i em seguieu ensenyant.

Gracias a los amigos de Roche, a Carol y a Angel primero, y a Diana y Adolf después, sin vuestro apoyo y confianza este proyecto hubiera sido inviable.

Thanks to Dr. Schumacher, Frank, Hector and Fernando for your confidence in me, y por meterme en todos los líos que me habéis metido.

Per la Marian. Aguantar algú que es desperta cada dia a les 5 del matí y aprofita dissabtes, diumenges i vacances per anar avançant tesi a vegades es fa costa amunt i després encara repassar-la lletra per lletra millorant conceptes i escriptura té molt mèrit, gràcies Marian. Gràcies per aguantar-me i per fer-m'ho més fàcil.

Pel Jaume i la Mariona, per preguntar-me cada matí al despertar-se com anava la tesi, per totes les tecles que no us he deixat tocar quan volíeu ajudar-me. Guarnir-la ha estat llarg, però ja veieu com al final l'hem acabat.

Pels meus pares, pel que m'han ensenyat i m'han recolzat. I també juntament amb ells, pel Sergi, la Núria, la Bea, el Pepe, la Magda, el Carlos, la Lidia, la Trini i en Tomeu i la Catalina per tots els canguros i l'estima que em demostreu cada dia.

Per la padrina, per que només ella sap per el que està passant, molts d'ànims!

## Índice

### 1. Lista de abreviaciones

13

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2. Índice de figuras</b>  | <b>15</b> |
| <b>3. Índice de tablas</b>   | <b>17</b> |
| <b>4. Introducción</b>   | <b>19</b> |
| <b>4.1 Factores de riesgo de padecer artritis reumatoide</b>         | <b>19</b> |
| <b>4.1.1 Edad y género</b>   | <b>19</b> |
| <b>4.1.2 Genética</b>  | <b>20</b> |
| <b>Estudios en gemelos y hermanos</b>                                | <b>20</b> |
| <b>Genes</b>   | <b>20</b> |
| <b>Epítipo compartido</b>  | <b>21</b> |
| <b>Otros genes</b>   | <b>21</b> |
| <b>4.1.3 Tabaquismo</b>  | <b>22</b> |
| <b>4.1.4 Infecciones</b>   | <b>22</b> |
| <b>4.1.5 Autoanticuerpos</b>   | <b>24</b> |
| <b>Factor reumatoide</b>   | <b>24</b> |
| <b>Anticuerpos antipéptidos citrulinados</b>                         | <b>24</b> |
| <b>4.2 Patogenia</b>   | <b>25</b> |
| <b>4.2.1 Características de la sinovia en la artritis reumatoide</b> | <b>25</b> |
| <b>Íntima</b>  | <b>25</b> |
| <b>Subíntima</b>   | <b>26</b> |
| <b>Linfocitos T</b>  | <b>27</b> |
| <b>Linfocitos B</b>  | <b>28</b> |
| <b>Células dendríticas</b>   | <b>29</b> |
| <b>Citoquinas</b>  | <b>30</b> |
| <b>Producidas por linfocitos T</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>Producidas por macrófagos y sinoviocitos B</b>                    | <b>31</b> |
| <b>Angiogénesis y reclutamiento de células inflamatorias.</b>        | <b>32</b> |
| <b>Angiogénesis</b>  | <b>31</b> |
| <b>Reclutamiento celular</b>   | <b>32</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3 Clínica</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.3.1 Clínica articular</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.3.2 Clínica extrarticular</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.4 Diagnóstico</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.4.1 Diagnóstico precoz y la ventana de la oportunidad</b>                 | <b>36</b> |
| <b>4.4.2 Criterios diagnósticos</b>  | <b>36</b> |
| <b>Criterios ACR 1987</b>  | <b>37</b> |
| <b>Criterios ACR/EULAR 2010</b>  | <b>38</b> |
| <b>4.4.3 Pruebas de laboratorio</b>  | <b>38</b> |
| <b>Líquido sinovial</b>  | <b>38</b> |
| <b>Reactantes de fase aguda</b>  | <b>38</b> |
| <b>Factor reumatoide y anticuerpos antipéptidos citrulinados</b>               | <b>39</b> |
| <b>4.4.4 Pruebas de imagen</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.4.4.1 Radiología simple</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.4.4.2 Ecografía</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.4.4.3 Resonancia magnética nuclear</b>                                    | <b>39</b> |
| <b>4.5 Diagnóstico diferencial</b>   | <b>40</b> |
| <b>4.6 Principios generales en el manejo de la AR</b>                          | <b>41</b> |
| <b>4.6.1 Actividad de la enfermedad</b>  | <b>41</b> |
| <b>4.6.2 Tratamiento precoz, <i>treat to target</i> y <i>tight control</i></b> | <b>41</b> |
| <b>4.7 Tratamiento</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.7.1 Generalidades</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.7.2 Protocolos habituales</b>   | <b>42</b> |
| <b>Recomendaciones/Guía de Práctica Clínica SER</b>                            | <b>42</b> |
| <b>Recomendaciones EULAR</b>   | <b>44</b> |
| <b>Recomendaciones ACR</b>   | <b>45</b> |
| <b>4.7.3 Terapia farmacológica</b>   | <b>46</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Antiinflamatorios</b>  | <b>46</b> |
| <b>Corticoides</b>  | <b>46</b> |
| <b>Fármacos modificadores de la enfermedad</b>  | <b>47</b> |
| <b>Metotrexato</b>  | <b>47</b> |
| <b>Leflunomida</b>  | <b>48</b> |
| <b>Salazopyrina</b>   | <b>49</b> |
| <b>Sales de oro</b>   | <b>49</b> |
| <b>Antimaláricos</b>  | <b>50</b> |
| <b>Terapia combinada en la artritis reumatoide</b>  | <b>51</b> |
| <b>Terapias biológicas</b>  | <b>51</b> |
| <b>Anakinra</b>   | <b>52</b> |
| <b>Terapias anti-TNF</b>  | <b>52</b> |
| <b>Abatacept</b>  | <b>54</b> |
| <b>Tocilizumab</b>  | <b>54</b> |
|   | <b>55</b> |
| <b>4.8 Rituximab</b>  |           |
| <b>4.8.1 Introducción</b>   | <b>55</b> |
| <b>4.8.2 Cambios secundarios al tratamiento con rituximab en el sistema inmune en pacientes con artritis reumatoide</b> | <b>57</b> |
| <b>4.8.3 Eficacia</b>   | <b>60</b> |
| <b>4.8.4 Seguridad</b>  | <b>61</b> |
| <b>4.8.5 Niveles de rituximab</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.8.6 Alteraciones provocadas en el sistema inmune en otras conectivopatías tratadas con rituximab</b>               | <b>62</b> |
| <b>5. Hipótesis</b>   | <b>63</b> |
| <b>6. Objetivos</b>   | <b>65</b> |
| <b>7. Material y métodos</b>  | <b>67</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7.1 Pacientes y controles</b>   | <b>67</b> |
| <b>7.1.1 Criterios de inclusión</b>                                      | <b>67</b> |
| <b>7.1.2 Criterios de exclusión</b>                                      | <b>68</b> |
| <b>7.1.3 Características del tratamiento</b>                             | <b>68</b> |
| <b>7.1.4 Recogida de datos</b>   | <b>69</b> |
| <br>   |           |
| <b>7.2 Recogida de muestras</b>  | <b>72</b> |
| <br>   |           |
| <b>7.3 Citometría de flujo</b>   | <b>72</b> |
| <b>7.3.1. Anticuerpos utilizados para el fenotipado de linfocitos</b>    | <b>73</b> |
| <b>7.3.2. Análisis de la expresión de IL-15 en la superficie celular</b> | <b>77</b> |
| <br>   |           |
| <b>7.4. ELISA</b>  | <b>79</b> |
| <b>7.4.1. ELISA de IL-15</b>   | <b>79</b> |
| <b>7.4.2. ELISA de IL-17</b>   | <b>81</b> |
| <br>   |           |
| <b>7.5 Niveles de rituximab y anti-rituximab</b>                         | <b>82</b> |
| <br>   |           |
| <b>7.6 Análisis estadístico</b>  | <b>85</b> |
| <br>   |           |
| <b>8. Resultados</b>   | <b>87</b> |
| <br>   |           |
| <b>8.1 Datos basales de los pacientes</b>                                | <b>87</b> |
| <br>   |           |
| <b>8.2 Resultados clínicos</b>   | <b>89</b> |
| <b>8.2.1 Índices compuestos</b>  | <b>89</b> |
| <b>8.2.2 VSG y PCR</b>   | <b>92</b> |
| <b>8.2.3 HAQ</b>   | <b>93</b> |
| <b>8.2.4 Según la clasificación EULAR</b>                                | <b>94</b> |
| <br>   |           |
| <b>8.3 Resultados analíticos</b>   | <b>95</b> |
| <b>8.3.1 Hemograma</b>   | <b>95</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>8.3.2 Inmunoglobulinas</b>   | <b>96</b>  |
| <b>8.3.3 Autoanticuerpos: FR y a-CCP</b>                                    | <b>97</b>  |
| <b>8.3.4 Análisis de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica</b> | <b>98</b>  |
| <b>Linfocitos B</b>   | <b>98</b>  |
| <b>Linfocitos T y células NK</b>  | <b>100</b> |
| <b>Linfocitos T helper y citotóxicos de memoria y naïve</b>                 | <b>102</b> |
| <b>Correlación entre el DAS28 y la ratio de células</b>                     | <b>106</b> |
| <b>CD8+CD45RO+/RA+</b>  |            |
| <b>8.3.5 IL-15</b>  | <b>107</b> |
| <b>Niveles de IL-15 en suero</b>  | <b>107</b> |
| <b>Niveles de IL15 transmembrana</b>  | <b>108</b> |
| <b>Cambios en la ratio de células T helper y citotóxicas segun</b>          | <b>110</b> |
| <b>los niveles de IL-15 en suero</b>  |            |
| <b>8.3.6 IL-17</b>  | <b>111</b> |
| <b>8.3.7 Cambios en el número de células T reguladores</b>                  | <b>112</b> |
| <b>8.3.8 Niveles de rituximab</b>   | <b>114</b> |
| <b>Niveles de rituximab en el tiempo</b>                                    | <b>114</b> |
| <b>Asociación entre los niveles de rituximab y la actividad</b>             | <b>114</b> |
| <b>clínica y la deplección de células B</b>                                 |            |
| <b>Niveles de anticuerpo antirituximab</b>                                  | <b>116</b> |
| <b>9. Discusión</b>   | <b>117</b> |
| <b>10. Conclusiones</b>   | <b>125</b> |
| <b>11. Bibliografía</b>   | <b>127</b> |

## **1. Lista de abreviaciones**

-a-CCP: Anticuerpo antipéptidos citrulinados.

- ACR: American Colleague of Rheumatology (antes ARA: american rheumatology association).
- AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.
- ANA: Anticuerpo antinuclear.
- AR: Artritis reumatoide.
- CD: Clúster de diferenciación.
- CDAI: Clinical Disease Activity Index.
- CI: Intervalo de confianza.
- COX: Ciclooxygenasa.
- COXIB: Inhibidores selectivos de la ciclooxygenasa-2.
- DAS: Disease activity score.
- DE: Desviación estándar.
- EC: Epítipo compartido.
- EULAR: European league Against Rheumatism.
- EVA: Escala visual analógica.
- FAME: Fármaco modificador de la enfermedad.
- Fc: Fracción constante.
- FR: Factor reumatoide.
- GC: Glucocorticoides.
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos.
- HAQ: Health Assessment Questionnaire.
- HLA: Antígeno de histocompatibilidad leucocitario.
- IF: Interfalángicas.
- IFN: Interferón.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IL: Interleucina.
- LDH: Lactato deshidrogenasa.
- LES: Lupus eritematosos sistémico.
- MCF: Metacarpofalángica.
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- MTX: Metotrexato.
- NK: Natural killer.
- NYHA: New York Heart Association.
- OR: Odds Ratio.

- PADI: Peptidilarginina deiminasa.
- PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns.
- PCR: Proteína C Reactiva.
- PG: Prostaglandina.
- RANKL: Activador del receptor del ligando de NF- $\kappa$ B.
- rpm: Revoluciones por minuto.
- RTX: Rituximab.
- Salazopyrina: SSZ.
- sc: Subcutáneo.
- SDAI: Simplified Disease Activity Index.
- SEM: Error estándar de la media.
- SER: Sociedad Española de Reumatología.
- SS: Síndrome de Sjögren.
- Th: Linfocitos T helper.
- TLR: Toll Like Receptor.
- Tocilizumab: TCZ.
- Treg: Linfocitos T reguladores.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- VEB: Virus de Epstein-Barr.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VSG: Velocidad de sedimentación globular.

## **2. Índice de figuras.**

Introducción

Figura 1. Imágenes de la sinovia de una rodilla de un enfermo con artritis reumatoide.

Figura 2. Nódulo reumatoide en tejido sinovial.

Figura 3. Recomendaciones EULAR para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Figura 4. Estructura quimérica de rituximab.

Figura 5. Maduración y presentación del CD20 en los linfocitos B.

Figura 6. Mecanismos de acción de rituximab.

## Material y métodos

Figura 7. Selección de linfocitos según morfología celular.

Figura 8. Selección de linfocitos T helper y citotóxicos naïve y de memoria.

Figura 9. Ejemplo de determinación de IL-15 en la superficie de los monocitos.

## Resultados

Figura 10. Evolución clínica de los enfermos durante los 3 ciclos medida por DAS28.

Figura 11. Evolución clínica de los enfermos durante los 3 ciclos medida por SDAI y CDAI.

Figura 12. Evolución de la VSG y la PCR tras el tratamiento con rituximab.

Figura 13. Evolución del HAQ tras el tratamiento con rituximab.

Figura 14. Evolución de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas tras el tratamiento con rituximab.

Figura 15. Evolución de los niveles de inmunoglobulinas tras el tratamiento con rituximab.

Figura 16. Evolución de los niveles de factor reumatoide en suero tras el tratamiento con rituximab.

Figura 17. Evolución del número total y porcentaje de células B (CD19+) tras el tratamiento con rituximab.

Figura 18. Depleción de las células CD19+.

Figura 19. Evolución de las células CD3+ tras el tratamiento con rituximab.

Figura 20. Evolución de las células CD4+, CD8+ y CD56+ tras el tratamiento con rituximab.

Figura 21. Evolución del número absoluto y porcentaje de células CD4+RO+RA- tras el tratamiento con rituximab.

Figura 22. Evolución del número total y porcentaje de células CD4+RO-RA+ tras el tratamiento con rituximab.

Figura 23. Evolución del número total y porcentaje de células CD8+RO+RA- tras el tratamiento con rituximab.

Figura 24. Evolución del número total y porcentaje de células CD8+RO-RA+ tras el

tratamiento con rituximab.

Figura 25. Evolución de la expresión de CD45RO y CD45RA en linfocitos CD8+.

Figura 26. Correlación entre la actividad de la clínica de la artritis reumatoide medida por DAS28 y la ratio de células CD8+CD45RO+/RA+.

Figura 27. Niveles de IL-15 en suero de los enfermos con artritis reumatoide antes del tratamiento con rituximab.

Figura 28. Evolución de los niveles de IL-15 en suero.

Figura 29. Evolución del MFI de IL-15 transmembrana en los monocitos de los pacientes serIL15+ y serIL15-.

Figura 30. Ejemplo de expresión de IL-15 transmembrana al inicio y tras el tercer ciclo.

Figura 31. Evolución de la ratio de células T CD8+ memoria/naïve en los pacientes serIL15+ y serIL15- tras el tratamiento con rituximab.

Figura 32. Evolución de los niveles de IL-17 en suero en los pacientes tratados con rituximab.

Figura 33. Evolución de las células T reguladoras en los pacientes tras el tratamiento con rituximab.

Figura 34. Evolución de las células T reguladoras en un paciente representativo serIL15-.

Figura 35. Evolución de los niveles de rituximab en suero, basales y a los 30, 90 y 180 días tras la primera infusión.

Figura 36. Número de células B en sangre periférica tras el tratamiento con rituximab en el grupo A y en el grupo B.

### **3. Índice de tablas.**

Introducción.

Tabla 1. Patrones de presentación de la artritis reumatoide.

Tabla 2. Complicaciones y clínica extrarticular de la artritis reumatoide.

Tabla 3. Criterios de clasificación de la artritis reumatoide (ACR 1987)

Tabla 4. Diagnóstico diferencial de la artritis reumatoide.

Tabla 5. Fármacos inhibidores del TNF aprobados hasta la actualidad.

Tabla 6. Principales ensayos clínicos de rituximab.

Tabla 7. Cambios en el sistema inmune producidos en otras conectivopatías tratadas con rituximab.

Material y métodos.

Tabla 8. Criterios de inclusión en el estudio.

Tabla 9. Criterios de exclusión del estudio.

Tabla 10. Índices compuestos para medir la actividad clínica utilizados en el estudio.

Tabla 11. Clasificación EULAR de la actividad de la artritis reumatoide según DAS

Tabla 12. Criterios EULAR de respuesta al tratamiento.

Tabla 13. Anticuerpos utilizados para el fenotipado de linfocitos.

Tabla 14. Anticuerpos utilizados para el estudio citométrico de IL-15.

Tabla 15. Anticuerpos utilizados para el estudio de los niveles de rituximab.

Tabla 16. Reactivos suministrados en el kit para determinar los niveles de anticuerpos anti-rituximab

Resultados.

Tabla 17. Características basales sociodemográficas de los enfermos que participaron en el estudio.

Tabla 18. Características basales clínicas de la AR de los enfermos que participaron en el estudio.

Tabla 19. Características basales de tratamiento de los enfermos que participaron en el estudio.

Tabla 20. Cambios del DAS28 respecto al inicio del tratamiento y respecto a la infusión inicial de cada ciclo.

Tabla 21. Porcentaje de pacientes que consiguieron respuesta EULAR.

Tabla 22. Porcentaje de enfermos en los que se consigue la depleción de linfocitos B (células CD19+<0,5%).

Tabla 23. Decrementos de los valores clínicos y analíticos a los 180 días del tratamiento.

Tabla 24. Características basales de los grupos de pacientes respondedores y no respondedores.

Tabla 25. Características demográficas y de la enfermedad en los pacientes respondedores y no respondedores.

## **4. Introducción**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones y que se asocia a discapacidad progresiva, complicaciones sistémicas, muerte prematura y altos costes socioeconómicos [1]. La AR es, junto con

la gota, la artropatía inflamatoria más frecuente. Su prevalencia en España se estima cercana al 0,5% [2].

Los historiadores no consiguen ponerse de acuerdo en cuanto a las primeras referencias sobre la enfermedad. Se han descubierto erosiones compatibles con artritis reumatoide en esqueletos de nativos americanos de hace 6500 años [3], aunque no es hasta 1876, cuando Sir Alfred Garrod utiliza el término artritis reumatoide por primera vez para distinguirlo de la gota y de la fiebre reumática [4].

Saber cuando apareció la AR por primera vez tiene un gran interés, ya que si fuera una enfermedad más contemporánea significaría que los agentes encargados de activar la AR serían de nueva aparición, en cambio si existiese desde la antigüedad podría tratarse de antígenos que siempre han existido.

Lo curioso es que prácticamente no se ha hallado presencia histórica de AR ni en Europa ni en el norte de África hasta mediados del siglo XVII. Como si la enfermedad, o su causa, hubiera migrado del Nuevo al Viejo Mundo a través de las rutas comerciales, como hicieron ciertos agentes infecciosos o el tabaco.

## **4.1 Factores de riesgo de padecer artritis reumatoide**

### **4.1.1 Edad y género**

La AR puede aparecer a cualquier edad, pero su incidencia va en aumento a partir de los 40 años. Las mujeres están afectadas de dos a cuatro veces más que los hombres [2]. Se cree, que el motivo de esta diferencia es la estimulación del sistema inmune por los estrógenos. Los estrógenos inhiben la función celular T supresora y estimulan a los linfocitos T helper (Th) [5]. También se ha observado que las células B expuestas a estradiol son más resistentes a la apoptosis, lo que podría provocar que clones de células B autoreactivas pudieran escapar al mecanismo de tolerancia. Se ha visto que las mujeres nulíparas tienen más riesgo de padecer AR y en cambio la lactancia de más de un año protege [6].

El fenotipo de AR en hombres es distinto al femenino. En hombres la AR aparece más tarde y hay mayor presencia de factor reumatoide (FR), anticuerpos antipéptidos anticitrulinados (a-CCP) y del epítipo compartido (EC) [7].

### **6.1.2 Genética**

## **Estudios en gemelos y hermanos**

Los estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos son un claro ejemplo del componente genético de la AR. La tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos estaría cerca del 15% contra un 3,5% en gemelos dicigóticos o el 1% de la población general [8]. En un estudio sueco se observó que la razón de incidencia estandarizada de padecer AR fue de 3 en los hijos de padres afectados, de 4,6 si había un hermano afecto y de 9,6 si había dos o más miembros de la familia afectados. En los casos de enfermedad severa la concordancia entre hermanos era mayor. Todos estos datos sugieren que los factores genéticos son responsables de entre un 55 y un 65% de la enfermedad [9].

## **Genes**

### **El epítipo compartido**

Otra prueba de la susceptibilidad genética de padecer AR es el llamado epítipo compartido. El EC es una secuencia determinada de 5 aminoácidos (QKRAA, QRRAA o RRRAA) que se encuentran entre las posiciones 70 y 74 de la tercera región hipervariable de las cadenas  $\beta$  del HLA-DR. Esta secuencia específica se encuentra en las cadenas  $\beta$  de DR1, DR4 y DR14, sobretodo en DR $\beta$ \*0401, DR $\beta$ \*0404, DR $\beta$ \*0101, y DR $\beta$ \*1402 y se relaciona con la susceptibilidad y la severidad en enfermos con AR con a-CCP positivos [10]. Es más, hay estudios que demuestran la relación del EC con la AR con a-CCP positivos, pero no con enfermos con AR con a-CCP negativos [11].

En población española, la asociación más fuerte observada en la AR ha sido con el HLA-DR1 y el HLA-DR10. Del HLA-DR4, solo se encontró asociación con el alelo DRB1\*0405\* [12]. En la población de nuestro centro hemos confirmado una significativa asociación de los enfermos con AR, especialmente los seropositivos (con FR y/o a-CCP positivos), con los HLA que presentan el EC [13].

El epítipo compartido se encuentra en una región encargada de la presentación de antígenos al receptor del linfocito T [14], lo que sugiere que esta presentación será importante en la patogenia de la enfermedad. A pesar de ello se desconoce cuál es la función exacta del EC. Se sabe que la secuencia de aminoácidos no está situada en la hendidura encargada de unirse al antígeno específico del DR y se han postulado diversas hipótesis para intentar explicar como actuaría:

-Podría participar en la definición del repertorio de las células T en el timo.

-Podría alterar el tráfico intracelular del HLA-DR. Este HLA tendría una configuración que facilitaría la presentación del antígeno, aumentando la importancia relativa del cómo se presenta sobre la especificidad de un antígeno determinado.

-Interactuaría con la calreticulina presente en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno o de los linfocitos. En las células dendríticas esta interacción promovería una polarización hacia Th17. Así, en gente sana el EC sería beneficioso para permitir una respuesta Th17 frente a ciertos patógenos. En cambio, en sujetos predeterminados a padecer AR provocaría una polarización excesiva hacia Th17 y contribuiría al desarrollo de la enfermedad [15].

-El mimetismo molecular: entre otros, se ha observado la existencia de la secuencia característica de EC en una glicoproteína del virus de Epstein-Barr (VEB) [16].

-Otra posibilidad en algunos pacientes que no expresan un HLA con el EC sería el microquimerismo. Células maternas que sí que expresan el EC pasarían a la circulación fetal y podrían sobrevivir y persistir hasta la edad adulta. Un estudio ha demostrado que las mujeres con AR presentaron una mayor prevalencia y niveles más altos de microquimerismo de DRB1\*04 y DRB1\*01 que sus controles [17].

### **Otros genes**

Existen otros genes que se han asociado a la susceptibilidad y/o a la agresividad de la enfermedad. La mayoría se encargan de codificar citoquinas u otras proteínas que participan en la regulación inmune o en la transducción de señales [18].

De entre los más de 35 genes descritos, en población no asiática, destacan dos: el gen PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase N22) que codifica una fosfatasa involucrada en la señalización intracelular del linfocito T [19] y el STAT4, que es un factor de transcripción intracelular encargado de transmitir la señal de diversas citoquinas al núcleo [20].

### **6.1.3 Tabaquismo**

Hay múltiples estudios que asocian el tabaquismo con la AR, especialmente en individuos seropositivos y con el EC. Un estudio con más de 370.000 mujeres demostró que las que habían fumado más de 25 cigarrillos/día durante más de 20 años tenían un 40% más de posibilidades de padecer AR que las que nunca habían fumado [21]. En un estudio británico de gemelos con AR discordantes en tabaquismo,

se encontró que de los 13 casos hallados, en 12 el fumador era el que padecía la AR [22]. Este aumento del riesgo de padecer AR en pacientes con el EC y hábito tabáquico podría devenir por la citrulinización de proteínas en tejidos inflamados. Prueba de ello sería un estudio que encuentra asociación entre tener el EC, tener a-CCP y ser fumador y en cambio no la encuentra en caso de tener el EC, ser fumador y no tener a-CCP, incluso en casos con FR [23]. Un estudio de casos-controles con más de 500 enfermos con AR demostró que los pacientes homocigotos para el EC tenían un mayor riesgo de padecer una AR con a-CCP positivos (Odds Ratio (OR) 17,8). Si además le añadíamos el hábito tabáquico este riesgo se multiplicaba por 52,6 [24]. Finalmente, se ha demostrado, que en mujeres que habían dejado de fumar hacía más de 10 años, el riesgo de padecer AR se igualaba de nuevo al de las no fumadoras [25].

En lavados broncoalveolares de fumadores se han encontrado proteínas citrulinadas [26], lo que podría ser el estímulo que provocaría la aparición de a-CCP en individuos genéticamente susceptibles. A partir de aquí, la activación persistente del sistema inmune innato determinaría la aparición de autoreactividad y el inicio de la sinovitis.

#### **6.1.4 Infecciones**

Desde hace tiempo se ha postulado que algún germen tendría la capacidad de desencadenar los mecanismos necesarios para iniciar la AR y posteriormente perpetuarla. Se han propuesto diversas vías que explicarían esta hipótesis. Una activación repetida de la inmunidad innata a través de los receptores toll-like (TLRs) o, de nuevo, el mimetismo molecular son algunas de estas posibilidades.

Desde la década de los 70 se está buscando la relación entre el VEB y la AR. A favor de esta relación hay múltiples datos. Por un lado se ha demostrado que el VEB puede activar a las células B, incluidas las productoras de FR. Los pacientes con AR tienen una respuesta humoral y celular aumentada frente a antígenos que contienen la secuencia del EC. La glicoproteína gp110, presente en el VEB presenta esta secuencia [16]. Además, se ha visto que los enfermos con AR presentan una mayor carga viral de VEB en sangre y una mayor presencia del virus en sus frotis faríngeos que los controles.

Los TLRs, elementos básicos de la inmunidad innata, tienen la capacidad de reconocer determinadas estructuras que se encuentran en bacterias (los patrones moleculares asociados a patógenos o sus siglas en inglés: PAMPs). Los TLRs se encuentran en varias poblaciones leucocitarias. Cuando las células con TLRs reconocen un PAMP y a la vez son activadas por citoquinas o quimioquinas, pueden

estimular células presentadoras de antígeno, mejorar la respuesta inmune adaptativa, y desencadenar la liberación de más mediadores inflamatorios.

Estos TLRs se expresan en células sinoviales o en cultivos de sinoviocitos B. Por otro lado, se han encontrado peptidoglicanos bacterianos que actuarían como PAMPs en el tejido sinovial, sobretodo en macrófagos, de enfermos con AR [27]. La repetición del estímulo de los TLRs, y por tanto de la inmunidad innata podría ser la encargada de iniciar la enfermedad.

Existen otros muchos gérmenes estudiados, pero la asociación no es tan evidente. Entre ellos destacan algunos retrovirus, el virus de la rubéola, el parvovirus B19, micobacterias, micoplasmas o determinadas bacterias entéricas o cutáneas.

A principios de la pasada década se encontró una relación entre la AR y la *Porphyromonas gingivalis*, causante de enfermedad periodontal [28]. Esta bacteria genera péptidos citrulinados in vivo, lo que conduciría a la hipótesis de que, en individuos portadores del EC, se promovería la formación de a-CCP y estos contribuirían a desarrollar la AR [29].

Finalmente, cada vez más se especula con el papel del microbioma (flora bacteriana) gastrointestinal en la patogenia de la AR. Existen ya experimentos animales que demuestran que el microbioma tiene un impacto considerable para mantener el balance homeostático local. La pérdida de las especies comensales protectoras podría crear un desequilibrio en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa que provocaría una inclinación hacia una respuesta inflamatoria. Es posible que los enfermos con AR tengan un enterotipo distinto que podría activar o conducir a la autoinmunidad en aquellos con una genética que lo predisponga [30].

## **6.1.5 Autoanticuerpos**

### **Factor reumatoide**

El descubrimiento del factor reumatoide fue la primera prueba de que la AR era una enfermedad autoinmune. Posteriormente se han ido encontrado otros autoantígenos potenciales para la AR, como el colágeno tipo II o el gp39, pero de momento, el FR y

los a-CCP son los más relacionados con la aparición de la enfermedad y la agresividad de la misma [31].

El FR clásico, que es una inmunoglobulina (Ig) M contra la fracción constante (Fc) de IgG, es un factor de riesgo de padecer AR, puede aparecer antes del inicio clínico de la enfermedad y se asocia a un peor pronóstico [32]. Casi 70 años después de su descubrimiento su papel patogénico todavía no está totalmente definido.

El FR puede fijar y activar la vía clásica del complemento y puede formar parte de inmunocomplejos. Estos inmunocomplejos se han detectado en el tejido sinovial y en la superficie del cartílago, y podrán facilitar la fijación del complemento. Además, el FR que aparece en la AR es distinto al que aparece en individuos normales o con paraproteínas. En individuos sanos el FR suele ser IgM y de baja afinidad. En cambio, en la AR, el FR puede ser de cualquier clase. En este FR se detectan reordenamientos y mutaciones somáticas que mejoran su afinidad por la porción Fc del IgG. Esta mejoría de afinidad es un proceso dirigido por antígenos [33,34].

### **Anticuerpos antipeptidos citrulinados**

Los a-CCP son de más reciente descubrimiento. En 1979 se descubrieron los anticuerpos antiqueratina y posteriormente los anticuerpos antifactor perinuclear. Los estudios de estos anticuerpos desvelaron que ambos reconocían a la filagrina, una proteína de la epidermis encargada de agregar filamentos. Más tarde se descubrió que el determinante de la unión de los anticuerpos a la filagrina era la presencia de citrulina. La citrulina se forma por una modificación translacional de la arginina. La reacción de citrulinización es catalizada por la enzima peptidilarginina deiminasa (PADI) [35]. Los anticuerpos contra estos antígenos tienen más especificidad que el FR. El papel de los a-CCP en la patogenia de la AR aun no está completamente definido. Se ha encontrado una clara asociación entre ser fumador, la presencia del EC y los a-CCP en pacientes con AR [23].

Además se han encontrado proteínas citrulinadas en el líquido del lavado broncoalveolar de pacientes fumadores, pero no en el de los no fumadores. Además, la *Porphyromonas gingivalis* tiene la enzima PADI, responsable de la citrulinización de la arginina. Todos estos estudios relacionan tabaquismo, EC y periodontitis con el riesgo de padecer AR, sugiriendo que estas proteínas citrulinadas serían el nexo de unión de este proceso, posiblemente como neoantígenos. Como el FR, los a-CCP pueden activar la vía del complemento, pero en este caso tanto la vía clásica como la alternativa [36].

## 6.2 Patogenia

De forma global, se acepta que en el inicio de la AR intervienen unas causas predeterminadas (genética) sobre las que actuarán unos sucesos casuales (ambiente). El hipotético estímulo medioambiental provocaría una activación repetida de la inmunidad innata seguida de un aumento progresivo del proceso autoinmune hasta la aparición de la enfermedad clínica. Durante este tiempo, conocido como periodo preclínico, los niveles de autoanticuerpos, citoquinas proinflamatorias y reactantes de fase aguda irían aumentando [37]. Una vez se ha establecido la enfermedad, la sinovia se reorganizaría y se formaría el pannus. El pannus se comporta en muchos aspectos como una neoplasia local activa y va destruyendo el cartílago y el hueso periarticular.

### 6.2.1 Características de la sinovia en la artritis reumatoide

#### Íntima

En la AR el revestimiento (lining) sinovial sufre diversos cambios. Hay un aumento de grosor de 1-2 a 6-10 células. Esta hiperplasia es provocada sobre todo por un aumento de los sinoviocitos tipo A (tipo macrófago) [38]. Estas células expresan CD68, CD14, receptores de Fc y muchas moléculas de HLA-DR y provienen de la médula ósea local [39]. Los monocitos del torrente sanguíneo entran en las articulaciones afectas y se diferencian para convertirse en sinoviocitos tipo A de la íntima y de la subíntima. Estos sinoviocitos además de su capacidad fagocítica, son células presentadores de antígeno que ayudan a reclutar células T y son una fuente importante de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1) o la IL-6 y de metaloproteasas o catepsinas [40].

En cambio, los sinoviocitos tipo B (tipo fibroblasto) no expresan moléculas HLA-DR, pero presentan moléculas de adhesión como el VCAM-1 o la cadherina 11. Los sinoviocitos B se dividen localmente en la sinovia [41]. Pueden crecer sin necesidad de estar adheridos, expresan factores de transcripción como el c-myc, característico de células neoplásicas, sobreexpresan microRNAs asociados a un aumento de la producción de citoquinas, producen proteasas capaces de degradar cartílago y pueden migrar de una articulación a otra. Estas características no las comparten con los fibroblastos presentes en otros tejidos o con los sinoviocitos B presentes en otras patologías como la artrosis.

## Subíntima

En la subíntima (sublining) aparece un infiltrado de células inflamatorias. Este infiltrado está formado mayoritariamente por macrófagos y linfocitos, que pueden distribuirse de manera difusa o formar agregados. Dentro de los linfocitos predominan los T CD4+, estando el ratio CD4+/CD8+ aumentado respecto a suero. La mayoría de estas células son de memoria (CD45RO+). Los linfocitos T CD8+ son menos frecuentes y suelen estar difusos. Hay también células B y células plasmáticas que se localizan en forma de agregados o en focos.

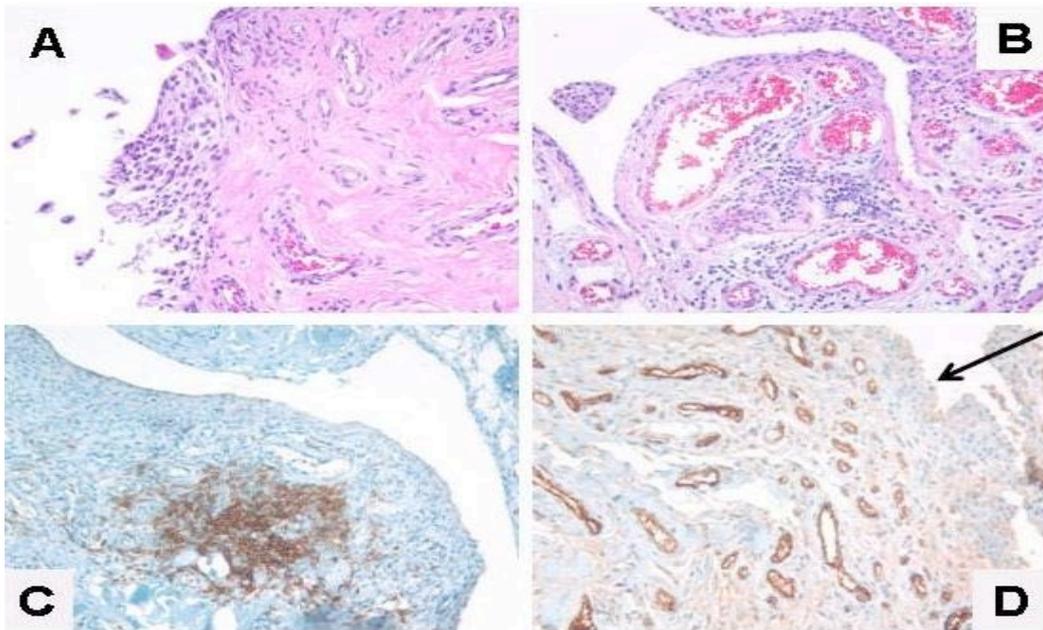


Figura 1. **Imágenes de la sinovia de una rodilla de un enfermo con artritis reumatoide.** A) y B) Tinción con hematoxilina eosina. A) Se observa la hiperplasia de la íntima, aumentando el grosor de 1-2 células a 6-10 células. B) Se observa el infiltrado linfocitario característico en la subintima sinovial. C) Inmunotinción con CD3. Se observa un infiltrado con predominio de linfocitos T en la subíntima sinovial. D) Inmunotinción con factor Von Willebrand (endotelio vascular). Se observa la elevada proliferación vascular típica de la AR.

Destaca también la presencia de células dendríticas CD86+, con la capacidad de activar a los linfocitos T en reposo. Estas células están presentes en sangre y tejido sinovial, pero es de principal importancia su hallazgo dentro de los agregados de linfocitos T [42].

En la sinovia de la AR hay un aumento de la angiogénesis. A pesar del aumento del número absoluto de vasos, este es insuficiente para nutrir a la masa de tejido que se está formando, por lo que se produce una isquemia tisular local. La isquemia es un estímulo que provoca el crecimiento de más vasos sanguíneos, además de que el medio de citoquinas proinflamatorias existentes en la articulación también contribuye a ello.

El pannus es una membrana que se deriva de la sinovia y que se adhiere a la superficie del cartílago y hueso. Las células del pannus, mediante distintas proteinasas, destruyen este cartílago y hueso provocando el pinzamiento articular y las erosiones óseas [43]. Se han observado células multinucleadas con fenotipo de osteoclastos en lagunas de resorción ósea en el límite pannus/hueso [44]. Células T CD4+ sinoviales producen factor diferenciador de osteoclastos, que provocan la transformación de las células mononucleares de sangre periférica en osteoclastos [45].

## **Linfocitos T**

Las células T constituyen más del 50% de las células de la sinovia. La mayoría son CD4+ y están activadas (HLA-DR+, CD27+, CD69+).

Las células T pueden distribuirse de diversas maneras, además esta distribución varía con el tiempo. Las células T pueden disponerse de forma difusa o en manto, con predominio en las zonas perivasculares, o bien formar agregados linfocitarios, pudiendo incluso formar centros germinales ectópicos. En el centro de los agregados encontramos células B, algunas células T CD8+ dispersas, pero sobretodo predominan células T CD4+ de memoria (RO+). En la periferia del agregado se localizan linfocitos, células plasmáticas y macrófagos [46]. Estos agregados están presentes en un 15-25% de los pacientes, y se asocian a una mayor producción de FR y a-CCP, pero sorprendentemente, no a una mayor actividad clínica [47].

En la sinovia se observa un predominio de células Th1 y Th17 respecto a células Th2 y células T reguladoras (Treg).

Es conocido que para la activación de las células T es necesario un segundo estímulo. Las moléculas que median la coestimulación son: CD28 y CD40L. El CD40 se expresa en linfocitos B, monocitos y células dendríticas. La unión CD40L-CD40 aumenta la producción de inmunoglobulinas, activa los monocitos y provoca la diferenciación de las células dendríticas. En la AR las células T expresan más CD40L y estas son más funcionales que las de los linfocitos T de controles [48]. Por otro lado, el bloqueo de la interacción CD28-B7 con abatacept (CTL4-Ig) ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de la AR [49].

Las células T sinoviales producen múltiples factores proinflamatorios, como el activador del receptor del ligando NF- $\kappa$ B (RANKL), la IL-17 y la IL-15, que conjuntamente con otras citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 o el TNF- $\alpha$  estimulan la aparición y activación de los osteoclastos que serán responsables de las erosiones típicas de la AR [50].

## Linfocitos B

Esta ampliamente aceptado que la AR esta mediada por citoquinas proinflamatorias producidas sobre todo por los macrófagos y fibroblastos sinoviales y dirigidas por el linfocito T. Pero, el éxito de la depleción de células B en el tratamiento de la AR ha obligado a reanalizar el papel de estas células en la patogenia además de en el tratamiento.

En la sinovia de la mitad de los pacientes con AR se observan células B. Estas células B están formando agregados conjuntamente con las células T. Alrededor de estos agregados podemos encontrar células plasmáticas [46].

Los linfocitos B, aparte de ser los precursores de las células plasmáticas y por tanto productores de inmunoglobulinas tienen otras funciones, que al igual que el linfocito T pueden ser pro o antiinflamatorias [51,52]:

- Secretan citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-1) y antiinflamatorias (IL-10) [53,54]

- Pueden activar o inhibir a las células T. Hay estudios que demuestran que pueden activar a las células T CD4+ y CD8+, mantener a las células T CD8+ de memoria, inducir células Th1 y Th17 y suprimir a las células T reguladoras. Se ha demostrado además que la activación de las células T en los agregados linfocitarios sinoviales en la AR depende de las células B [55,56].

- Reclutan células dendríticas.

- Participan en la linfoangiogénesis.

- Actúan como células presentadoras de antígenos. En un modelo de ratón SCID al que se le explantó sinovia reumatoide se observó que la activación de células T, la linfocitogénesis y la producción de citoquinas dependía de las células B [55].

- Son necesarias para la organización de la arquitectura del tejido linfoide y de la neogénesis linfoide ectópica. Por lo que sería básica en la organización de los agregados presentes en la sinovia [57]. Esta función es crucial en la patogénesis de la AR. Los infiltrados linfocitarios pueden organizarse tanto estructuralmente y funcionalmente como centros germinales y jugar un papel importante a través de la amplificación local de las células B autoinmunes y de la generación de células plasmáticas.

En la AR, se ha comprobado que las células B sinoviales presentan hipermutaciones en el reordenamiento de los genes, y que estas han estado dirigidas por antígenos. Esto nos permite diferenciar distintos clones de células B. Se han encontrado clones celulares distintos en los mismos infiltrados, así como células del mismo clon en

distintas articulaciones o en sangre periférica, lo que nos permite concluir que las células B se transportan de un lugar a otro. Esto favorecería la hipótesis de que células B mutadas aparecidas en la AR temprana colonizan los centros germinales de otras articulaciones [58-60].

En el actual conocimiento del papel del linfocito B en la AR y en el inicio del uso de rituximab como terapia de la AR destaca Jonathan Edwards. Demostró que las células B que expresaban anticuerpos en su superficie con propiedades de FR podían servir de células presentadoras de antígenos universales y que eran capaces de amplificar la respuesta autoinmune a través de la captura e internalización mediada por FR de inmunocomplejos circulantes que contenían cualquier tipo de autoantígenos [61].

Los a-CCP o inmunocomplejos que contienen FR o a-CCP pueden estimular la producción y secreción de TNF por los macrófagos a través de la unión con distintos receptores celulares (Fcγ y C5a).

### **Células dendríticas**

Las células dendríticas son potentes presentadores de antígenos que se encuentran en el líquido y en el tejido sinovial. Las células dendríticas normalmente están en las mucosas o en la piel, donde procesan antígenos para después migrar a tejidos linfoides centrales y presentar el antígeno al linfocito T. Actualmente se postula, que las células dendríticas podrían cargarse de antígenos en la sinovia y posteriormente dirigirse a los tejidos linfoides secundarios y así participar en el inicio de la AR [42].

La sinovia puede actuar como tejido linfoide, encontrándose en ella células dendríticas maduras (CD86+, CD83+) localizadas en los agregados, en los infiltrados linfocitarios perivasculares o en las estructuras similares a centros germinales, donde contactarían con los linfocitos a quienes pueden presentar sus antígenos.

### **Citoquinas**

Las citoquinas son glicoproteínas potentes, pleiotrópicas y redundantes que regulan el funcionamiento del sistema inmune formando una compleja trama que se encarga del normal funcionamiento del mismo. Una fallo en la regulación de las mismas, que favoreciera las citoquinas proinflamatorias, o que suprimiera las citoquinas supresoras, produciría un aumento de la respuesta inmune.

En la AR, a pesar de ser una enfermedad heterogénea, existen una serie de alteraciones comunes en la regulación de estas citoquinas.

Aunque inicialmente se clasificaron por orden de descubrimiento, hoy en día existen diversas familias de citoquinas caracterizadas por una similitud estructural, aunque puedan tener funciones diferentes.

### **Citoquinas producidas por los linfocitos T**

Podemos dividir la contribución de las citoquinas al proceso autoinmune dependiendo de la subclase de linfocito que la produce.

-Los linfocitos Th1 producen sobre todo interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2. El IFN- $\gamma$  es un potente inductor de la expresión de HLA-DR y activador de macrófagos. Además aumenta las moléculas de adhesión en el endotelio facilitando la llegada de células a la zona. La IL-2 es un factor de crecimiento autocrino y paracrino de células T.

En la AR los niveles de IFN- $\gamma$  en la articulación son detectables, pero bajos, y los de IL-2 se detectan solo en un pequeño porcentaje de enfermos [62].

-Las citoquinas producidas por los linfocitos Th2 son la IL-4, la linfotóxina- $\alpha$  y la IL-10. Los niveles de IL-4 y de linfotóxina- $\alpha$  son casi indetectables y los de IL-10, con actividad antiinflamatoria, son muy inferiores a los niveles de IFN- $\gamma$ . Además con la evolución de la enfermedad, los niveles de citoquinas Th2 dependientes van disminuyendo [63].

Se han realizado diversos estudios tratando a pacientes con AR con IL-10 recombinante, pero los resultados no han sido clínicamente satisfactorios [64].

-La IL-17, producida por el linfocito Th17, tiene funciones parecidas a la IL-1 o al TNF. La IL-17 se encuentra de manera relevante en el líquido y tejido sinovial y además sinergiza con otras citoquinas activando a los sinoviocitos para que produzcan enzimas proteolíticas y más citoquinas proinflamatorias [65] y favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos.

### **Citoquinas producidas por los macrófagos y los sinoviocitos B**

Son las citoquinas más abundantes en el líquido y tejido sinovial de la AR.

-Superfamilia de la IL-1: la IL-1 es producida por los macrófagos. Casi la mitad de los macrófagos sinoviales expresan IL-1 $\beta$ . Se encuentra sobretodo en la íntima, en los macrófagos cercanos a los sinoviocitos B y en la subíntima cercanos a los vasos. La IL-1 provoca un aumento de los sinoviocitos B, de las citoquinas IL-6, IL-8 y factor

estimulador de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF) y de las prostaglandinas y colagenasas.

La IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra) es un inhibidor natural que se une a los receptores de la IL-1. A pesar de tener una alta afinidad por ellos su acción es débil, ya que la IL-1 puede activar a sus células diana ocupando muy pocos receptores.

La IL-1Ra está presente en el líquido y tejido sinovial y la producen neutrófilos y macrófagos.

La IL-18 está producida por los macrófagos y los sinoviocitos B. Regula la respuesta inmune hacia Th1 en presencia de IL-12 o hacia Th2 en presencia de IL-4. La IL-18 induce la expresión y producción de óxido nítrico, GM-CSF y TNF.

-Superfamilia del TNF: existen hasta 19 miembros de esta familia, pero uno de los que tiene un rol predominante en la AR es el TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  está principalmente producido por los macrófagos. Inicialmente se expresa como una proteína transmembrana, donde ya es activo, y posteriormente pueden liberarse gracias a la TNF-convertasa. Sus funciones son similares a la IL-1. Estimula la activación de los macrófagos y provoca un aumento de la producción de citoquinas, de las moléculas de adhesión y de las metaloproteasas [66]. También induce la resorción ósea y aumenta la producción de prostaglandinas.

-Superfamilia de la IL-6: la IL-6 es una compleja citoquina producida por las células T, los macrófagos, y sobretodo por los sinoviocitos tipo B. Induce la síntesis de inmunoglobulinas por parte de las células B, participa en la diferenciación de linfocitos T citotóxicos e induce la producción de reactantes de fase aguda como la PCR. La IL-6 se encuentra de forma abundante tanto en el líquido como en el tejido sinovial. El tratamiento con tocilizumab, un inhibidor de la IL-6R es efectivo tanto clínicamente como en la inhibición de la resorción ósea [67].

Existen otros miembros de la familia de la IL-6, como la oncostatina M, el factor inhibidor de la leucemia o la IL-11.

-Otras citoquinas: el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) es producido por los macrófagos sinoviales. Una de sus funciones es inducir la expresión del HLA-DR en las células presentadoras de antígenos.

La IL-15 es producida por macrófagos. Produce quimiotaxis y proliferación de células T y aumenta la producción de inmunoglobulinas por las células B además de facilitar el "switch" de inmunoglobulinas [68]. En la sinovia, la producción local de IL-15 induce la producción de TNF a través de la activación de las células T sinoviales [69]. Se han realizado ya estudios con anticuerpos anti-IL-15 con resultados positivos [70].

El “Transforming Grow Factor”  $-\beta$  es considerada una citoquina reparadora. Inhibe la activación y proliferación de células T, la proliferación y diferenciación de las células B y la síntesis de metaloproteasas.

## **Angiogénesis y reclutamiento de células inflamatorias**

### **Angiogénesis**

Una de los primeros procesos que se observa en la generación de la nueva sinovia hiperplásica es la aparición de abundante angiogénesis. El nuevo tejido, debido al rápido crecimiento y al aumento de la presión positiva provocado por el líquido sinovial provoca una situación de hipoxia tisular. La presión de oxígeno media puede llegar a ser menor de 15 mmHg. La hipoxia provocará un aumento de transcripción del factor de hipoxia inducible-1 que a su vez aumenta la síntesis del factor de crecimiento endotelial y de sus receptores. La angiogénesis es la bastida de todo el nuevo tejido sinovial, y sin ella no es posible entender la enfermedad [71]. Anticuerpos contra distintos factores angiogénicos han demostrado ser útiles en distintos modelos animales, y las terapias anti-TNF la disminuyen.

### **Reclutamiento celular**

A medida que se van formando los nuevos vasos, las células endoteliales, estimuladas por diversas citoquinas (IL-1, IL-6,...), expresan moléculas de adhesión (como las moléculas de adhesión intercelular o vascular (ICAM-1 o VCAM-1) o las selectinas E y P. Estas moléculas permiten la diapédesis y extravasación de los leucocitos a la sinovia. Una vez en ella los linfocitos, al expresar VLA-4 (Very Late Antigen-4), ligando del VCAM-1, muy presente en la sinovia, permanecerán en ella, en cambio, los neutrófilos, al no expresarlo pasaran al líquido sinovial [72].

## **6.3 Clínica**

### **6.3.1 Clínica articular**

La AR suele presentarse como una poliartritis aditiva y simétrica. Inicialmente suele afectar al segundo y tercer dedo de las manos y a partir de aquí puede extenderse al resto del cuerpo. Característicamente la AR suele respetar a las articulaciones

interfalángicas (IF) distales y a las articulaciones de la columna, con la excepción de la articulación atlantoaxoidea.

La AR puede presentar diversos patrones (tabla 1):

Tabla 1. **Patrones de presentación de la artritis reumatoide**

|   |
|---|
| <u>AR clásica</u><br>Suele iniciarse de manera insidiosa, pero puede presentarse también de forma brusca o intermedia. Suele acompañarse de rigidez matutina, cansancio vespertino, anorexia y debilidad muscular.  |
| <u>AR “del viejo” o EORA (<i>Elderly onset rheumatoid arthritis</i>)</u><br>Cuando la enfermedad debuta a partir de los 60 años la presentación inicial de la AR como una polimialgia reumática es más frecuente. Encontramos una menor proporción de enfermos seropositivos, hay una menor afectación articular y responden mejor a la terapia con dosis bajas de corticoides. |
| <u>Reumatismo palindrómico</u><br>La AR debuta con un patrón de artritis, normalmente monoarticular, que dura de horas a pocos días, remitiendo y permaneciendo el sujeto sano de días a meses hasta el siguiente episodio.   |
| <u>AR robustus</u><br>Suele darse en hombres. Se presenta con una gran sinovitis, con deformidad, pero que causa poco dolor y discapacidad.   |
| <u>Monoartritis</u><br>Raramente la AR se iniciará como monoartritis para progresar en semanas o meses a una AR clásica.  |

### 6.3.2 Clínica extrarticular

Las complicaciones y clínica extrarticular más frecuentes se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. **Complicaciones y clínica extrarticular de la artritis reumatoide**

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Sistémica [73]             | <p>-Fatiga: Prácticamente constante. Es relevante en un 40%.</p> <p>-Osteoporosis: Secundaria a la actividad inflamatoria, a la menor movilización y al uso crónico de corticoides.</p> <p>-Debilidad muscular: Frecuente y con distintas causas.</p>   |
| Neumológica [74]           | <p>-Derrame pleural: Común, pero solo entre un 5 y un 20% dan clínica.</p> <p>-Enfermedad intersticial pulmonar: se da sobre todo en AR severas y de larga evolución y en fumadores. Los patrones de afectación más frecuentes son la neumonía intersticial usual y la neumonía intersticial no específica. La clínica, la patogénesis y la presentación no son distintas a las de las fibrosis pulmonares idiopáticas, aunque el pronóstico suele ser mejor.</p> <p>Nódulos reumatoides: que son la única presentación específica de la AR. Suelen ser subpleurales.</p> |
| Ocular                     | <p>La sequedad es la complicación más frecuente del ojo de los enfermos afectados por AR. Puede ser secundaria a un SS.</p> <p>Escleritis: Frecuente y benigna.</p> <p>Epiescleritis: Rara, pero puede ser grave, especialmente la escleritis perforans.</p>  |
| Nódulos reumatoides [73]   | <p>Ver figura 2. Suelen ser subcutáneos y localizarse en zonas de roce, pero pueden encontrarse en cualquier localización.</p>  |
| Cardiovascular [75-77]     | <p>La AR se considera por sí misma un factor de riesgo cardiovascular. La European League Against Rheumatism (EULAR) presentó unas recomendaciones sobre el manejo del riesgo cardiovascular en pacientes con AR, que incluía un índice SCORE modificado.</p> <p>Los enfermos con AR tienen un mayor riesgo de presentar insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular y accidentes cerebrovasculares.</p> <p>Pericarditis: Frecuente, pero pocas veces clínica.</p>  |
| Vasculitis reumatoide [78] | <p>Aparece en enfermos de larga evolución, con enfermedad erosiva y nódulos reumatoides. Afecta sobre todo a la piel, los nervios periféricos, los ojos y el corazón.</p>   |
| Hematológica [79,80]       | <p>Anemia: de procesos crónicos o de etiología mixta.</p> <p>Síndrome de Felty: en pacientes con AR seropositiva y larga evolución.</p>   |
| Cutánea                    | <p>La afectación cutánea más frecuente es el nódulo reumatoide.</p>   |

|                     |   |
|---------------------|---|
|                     | Las vasculitis cutáneas no son frecuentes y van desde infartos ocasionales en los pliegues ungueales a piodermas gangrenosos graves. El fenómeno de Raynaud se da hasta en un 25%.  |
| Neurológica [81]    | El síndrome del túnel del carpo es la manifestación más común. La afectación de la articulación atlantoaxoidea puede provocar la subluxación de la misma pudiendo provocar mielopatía compresiva. A pesar de que no es una complicación infrecuente, sí que lo es su presentación con clínica y la necesidad de cirugía   |
| Cáncer [82]         | Los pacientes con AR tienen un mayor riesgo de padecer linfomas, leucemias y cáncer de pulmón. Se cree que esto es debido a que la enfermedad de base produce alteraciones en el sistema inmune encargado de vigilar la aparición de neoplasias. En cambio se ha visto un menor riesgo de cáncer de colon (que podría ser debido al uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)) y de mama.   |
| Infecciones [83,84] | La frecuencia de infecciones en los enfermos con AR está aumentada. Las más frecuentes son las óseas, articulares, cutáneas, de vías respiratorias y de partes blandas. Los factores pronósticos de infección más importantes son: la edad, la presencia de manifestaciones extraarticulares, la presencia de leucopenia, la presencia de otras comorbilidades y el tratamiento con glucocorticoides o con terapias biológicas. El tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs) no se ha asociado a una incidencia aumentada de infección. |

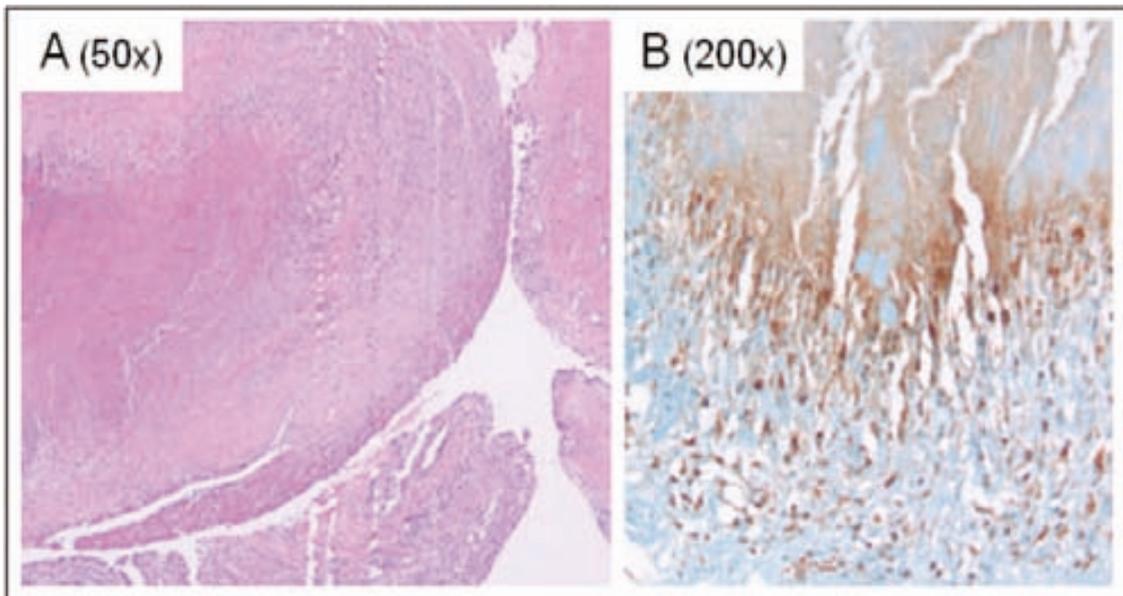


Figura 2. **Nódulo reumatoide en tejido sinovial.** Puede observarse la zona central necrosada (zona rosa o azul) con los histiocitos en empalizada rodeándola. En la muestra teñida con hematoxilina eosina se observa además la hiperplasia de la íntima.

## 6.4 Diagnóstico

### 6.4.1 El diagnóstico precoz y la ventana de la oportunidad

Estos dos conceptos, junto al “treat to target” (tratar hasta el objetivo) y el “tight control” (control estricto) han pasado a formar parte de la base del manejo de la AR.

Uno de los retos esenciales del reumatólogo es el diagnóstico precoz de la enfermedad junto con un inicio de tratamiento con FAMEs rápido e intenso. El daño articular provocado por la AR se inicia de manera temprana y se ha demostrado que los tratamientos instaurados precozmente son más efectivos que cuando son instaurados tardíamente [85,86]. Este es el motivo fundamental que obligó a la creación de los nuevos criterios de clasificación de la AR. Llamamos "ventana de la oportunidad" al tiempo desde el inicio de la clínica hasta la aparición de alteraciones estructurales.

### 6.4.2 Criterios diagnósticos

Actualmente se utilizan dos criterios diagnósticos: los clásicos de 1987 y los de consenso ACR/EULAR del 2010.

## Criterios ACR 1987

Los criterios revisados para la clasificación de la AR creados por la ARA (actualmente ACR) en 1987 [87] han sido los más utilizados hasta la fecha. Estos criterios se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. **Criterios para la clasificación de la artritis reumatoide (ACR 1987)**

| Criterio diagnóstico               | Descripción   |
|------------------------------------|---|
| Rigidez matutina                   | Rigidez matutina en o alrededor de las articulaciones, de cómo mínimo una hora de duración hasta la máxima mejoría.   |
| Artritis de 3 o más articulaciones | Como mínimo 3 áreas de las siguientes (de 14 posibles: IF proximales, metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos o metatarsfalángicas (MTF) presentan artritis simultáneamente (valoradas por un médico).          |
| Artritis de las manos              | Al menos una de las áreas definidas en el punto anterior es en muñeca, MCFs o IFs proximales.   |
| Artritis simétrica                 | Afectación simultánea de la misma articulación en los dos lados del cuerpo (artritis bilateral de IF proximales, MCFs o MTFs, aunque una simetría no absoluta es aceptable)   |
| Nódulos reumatoides                | Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas o en superficies extensoras, o en regiones yuxtarticulares observadas por un médico.   |
| Positividad del factor reumatoide  | Demostración de niveles anormales de FR por cualquier método que sea positivo en menos del 5% de los controles sanos.   |
| Cambios radiográficos              | Cambios radiográficos típicos de AR en radiografía posteroanterior de mano o muñeca, que deben incluir erosiones u osteoporosis yuxtarticulares en o al lado de las articulaciones afectas (los cambios artrósicos solos no cuentan). |

Nota: Podemos clasificar a un paciente como AR si cumple como mínimo 4 de estos criterios (los criterios clínicos han de estar presentes como mínimo 6 semanas)

Estos criterios tienen como gran defecto su limitado rendimiento en la AR temprana. En ella los criterios clínicos son muy sensibles, pero poco específicos, y los analíticos y radiográficos son muy específicos pero poco sensibles. El número de criterios cumplidos por los enfermos aumenta con la progresión de la enfermedad [88].

## **Criterios ACR/EULAR 2010**

En el año 2010 aparecieron los nuevos criterios de clasificación de la artritis reumatoide ACR/EULAR 2010 [89], que no utilizamos en nuestro estudio al ser posteriores al diagnóstico de los pacientes. Estos nuevos criterios, que son más sensibles en estadios iniciales, están en concordancia con los nuevos conceptos de una terapia más precoz e intensiva.

### **6.4.3 Pruebas de laboratorio**

#### **Líquido sinovial**

El estudio del líquido sinovial es útil en la confirmación de la presencia de artritis y en el diagnóstico diferencial de la AR, especialmente en el caso de la artropatía por depósito de cristales de pirofosfato cálcico, sin embargo es poco útil en el diagnóstico propio de la AR. En el líquido sinovial, además de comprobar la presencia de cristales, descartaremos la presencia de infección, determinaremos el número y tipo de células y realizaremos un análisis bioquímico (niveles de glucosa, lactato deshidrogenasa (LDH)...) e inmunológico (FR, complemento...).

#### **Reactantes de fase aguda**

Los reactantes de fase aguda, básicamente la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG), son útiles sobre todo para el seguimiento de la enfermedad, pero menos útiles en su diagnóstico. Estos parámetros reflejan la existencia e intensidad de la inflamación, pero no son específicos de la AR.

La PCR tiene algunas ventajas sobre la VSG, es independiente de la hemoglobina o de la concentración de las inmunoglobulinas y se eleva y disminuye más rápido que la VSG ante los cambios inflamatorios.

La presencia de VSG y PCR elevadas se asocia a una mayor probabilidad de aparición de enfermedad erosiva a lo largo del tiempo [90].

## **Factor reumatoide y anticuerpos antipéptidos citrulinados**

El FR es positivo en aproximadamente un 75-80% de los enfermos con AR. Es un marcador bastante inespecífico, ya que puede aparecer en gente sana, aumentando con la edad, y en otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES) o el síndrome de Sjögren (SS). La utilidad diagnóstica del FR es mayor a títulos más altos y si se utiliza en la población adecuada. El FR tiene también utilidad pronóstica [91].

Los a-CCP tienen una sensibilidad similar al FR, pero tienen una mayor especificidad [92]. Al igual que el FR los a-CCP tienen también valor pronóstico [93].

### **6.4.4 Pruebas de imagen**

#### **Radiología simple**

Las imágenes características de la AR son la osteoporosis yuxtarticular, las erosiones marginales y la disminución del espacio interóseo.

La radiología simple se ha utilizado clásicamente para medir la progresión de la enfermedad y nos permite realizar una evaluación seriada de la misma. Para ello se han creado múltiples índices que miden la presencia de erosiones y pinzamientos articulares en manos y pies. El más utilizado es el método Sharp/Van der Heijde [94].

#### **Ecografía**

La gran ventaja de la ecografía es que se trata de una técnica relativamente accesible e inocua que nos permite valorar si hay inflamación articular y cuantificarla.

Además, podemos diferenciar mediante la señal doppler si la hipertrofia sinovial presenta actividad inflamatoria o no.

#### **Resonancia magnética nuclear**

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica mucho más sensible y precoz que la radiología simple para detectar erosiones. Además nos permite visualizar si hay edema en la médula ósea. Este edema predice la aparición posterior de las erosiones óseas. La RMN permite también identificar y estimar la hipertrofia sinovial.

## 6.5 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial debe establecerse con las siguientes patologías (tabla 4):

Tabla 4. **Diagnóstico diferencial de la artritis reumatoide**

|   |   |
|---|---|
| Espondiloartropatías  | El diagnóstico diferencial debe hacerse sobre todo con la artritis reactiva y la artritis psoriásica. La presencia de clínica dermatológica, ocular o uretral puede servirnos para diferenciarlas.  |
| Artropatía por depósito de cristales de pirofosfato cálcico | El tipo pseudoAR se presenta como una poliartritis simétrica y periférica. El análisis del líquido sinovial permitirá realizar el diagnóstico diferencial.  |
| Fibromialgia  | Es muy prevalente. Se presenta con clínica de poliartralgias y una gran sensación de fatiga, pero no hay evidencia de inflamación.  |
| Infecciones   | Tanto la infección por VIH como las hepatitis B y C pueden presentarse como una poliartritis simétrica. Además en estos casos, especialmente en la hepatitis C, puede encontrarse un FR positivo.   |
| Artrosis erosiva de manos                                   | Al contrario que la AR, suele afectar a las articulaciones IFs distales y respetar las MCFs.  |
| Otras enfermedades autoinmunes sistémicas                   | Tanto el LES, como el SS o la polimialgia reumática pueden asemejar una AR. Además de la presentación de otra clínica acompañante, en estas enfermedades la aparición de erosiones óseas es infrecuente.  |
| Otras enfermedades  | La sarcoidosis, la hemocromatosis, la enfermedad de Still del adulto, la sinovitis vellonodular pigmentaria, la amilodosis, la fiebre reumática, la endocarditis bacteriana, la artropatía hemofílica, la fiebre reumática o las artritis paraneoplásicas pueden asemejar una AR. |

## **6.6 Principios generales en el manejo y tratamiento de la AR**

### **6.6.1 Actividad de la enfermedad**

La actividad de la enfermedad debe medirse en la visita inicial y durante todo el seguimiento. Se han creado distintos índices compuestos que nos permiten cuantificarla y por tanto medirla, y a partir de aquí además clasificarla.

Los más utilizados son el Disease Activity Score 28 (DAS28) [95], el Simplified Disease Activity Index (SDAI) [96] y el Clinical Disease Activity Index (CDAI)[97].

Estos índices nos permitirán además medir y determinar la respuesta a los fármacos.

Todos ellos nos permiten clasificar la AR según su actividad y clasificar la respuesta al tratamiento en buena, moderada o mala.

Todos estos índices tienen sus ventajas y sus inconvenientes, pero permiten a los profesionales responsables del manejo de los enfermos con AR "hablar el mismo idioma". Actualmente el DAS28 es el índice más utilizado y EULAR ha definido la respuesta al tratamiento utilizando este índice.

### **6.6.2 Tratamiento precoz, *treat to target* y *tight control***

El tratamiento con FAMEs en los pacientes con AR debe realizarse de la manera más precoz posible, incluso antes de que el paciente cumpla criterios de clasificación para así suprimir la inflamación existente y prevenir el daño óseo [86,98,99]. La mayor parte del daño óseo que después se traducirá en incapacidad aparece en la fase precoz de la enfermedad [100,101]. Se ha comprobado que en enfermos de menos de dos años de evolución ya se encuentra pinzamiento articular en un 80% y erosiones en dos terceras partes [101].

El objetivo del tratamiento de la AR es conseguir la remisión de la enfermedad, o en los casos en que ello no sea posible, una baja actividad, y además, lo más rápidamente posible. Una vez conseguido este objetivo se realizarán controles periódicos. En caso de que la actividad de la enfermedad aumente deberá modificarse la medicación para volver a conseguir la remisión o baja actividad de la enfermedad.

El control estricto define un abordaje que pretende conseguir una remisión rápida y mantenida de la enfermedad. Los enfermos que siguen estos principios consiguen una menor progresión del daño radiológico y mejores resultados funcionales que los que no los siguen [102,103].

## **6.7 Tratamiento**

### **6.7.1 Generalidades**

El manejo y tratamiento de la AR ha mejorado mucho en los últimos años gracias a un mayor entendimiento de la biología y de la historia natural de la enfermedad [104].

El tratamiento de la AR se basa en tres pilares.

- 1) Tratamiento no farmacológico; que incluye la educación del paciente, el reposo y el ejercicio y la terapia funcional.
- 2) Terapia farmacológica.
- 3) Cirugía, que está indicada en aquellos casos en que la enfermedad ha provocado destrucción ósea o articular y provoca una alteración funcional.

### **6.7.2 Protocolos habituales**

Existen diversos protocolos y recomendaciones para el tratamiento de la AR. En nuestro hospital utilizamos los de las sociedades española (SER), EULAR y ACR.

#### **Recomendaciones y Guía de Práctica Clínica de la SER**

El documento de consenso de la SER [105] propone que en caso de que el enfermo nunca haya tomado FAMEs inicie tratamiento con metotrexato (MTX). Se recomienda una escalada rápida de la dosis, hasta alcanzar los 20 ó 25 mg semanales, si fuera necesario, a los 3-4 meses de iniciar el MTX. En caso de refractariedad, se debe asegurar la biodisponibilidad del MTX administrándolo por vía subcutánea. Además de metotrexato, la leflunomida (LEF), ha demostrado una mayor eficacia que el resto de FAMEs.

En la AR de inicio sin marcadores de mal pronóstico (erosiones radiológicas, FR, a-CCP, ausencia de enfermedad extra-articular, un resultado en el Health Assessment Questionnaire (HAQ) superior a 1 o elevada carga inflamatoria) podría valorarse el tratamiento con otros FAMEs con menor perfil de toxicidad y menor complejidad en la monitorización como son la salazopyrina (SSZ) o los antipalúdicos.

La terapia biológica se valorará en los pacientes en los que el tratamiento con al menos un FAME relevante (MTX y LEF) no haya conseguido el objetivo terapéutico.

Los fármacos anti-TNF, el tocilizumab (anti IL-6) y el abatacept (CTL4-Ig) tienen indicación a fallo de FAME. Se considera a rituximab un fármaco de segunda línea, con indicación a fallo de otra terapia biológica previa.

Como los anti-TNF, la anti-IL-6 y la inhibición de la coestimulación inducen una rápida supresión de la inflamación y poseen una mayor eficacia que los FAMEs tradicionales en evitar el daño estructural. Por ello, se consideraría justificado evaluar la posibilidad de iniciar terapia biológica en pacientes con AR de inicio y menos de 1 año de evolución y en quienes se sospeche una evolución especialmente grave.

Se evaluará la eficacia del tratamiento a los 3-4 meses del inicio del mismo. Si se ha conseguido el objetivo terapéutico, se seguirán controles cada 3-6 meses.

Si no se ha conseguido el objetivo o se ha perdido la respuesta deberá replantearse la estrategia de tratamiento. En estos casos se recomiendan las siguientes posibilidades:

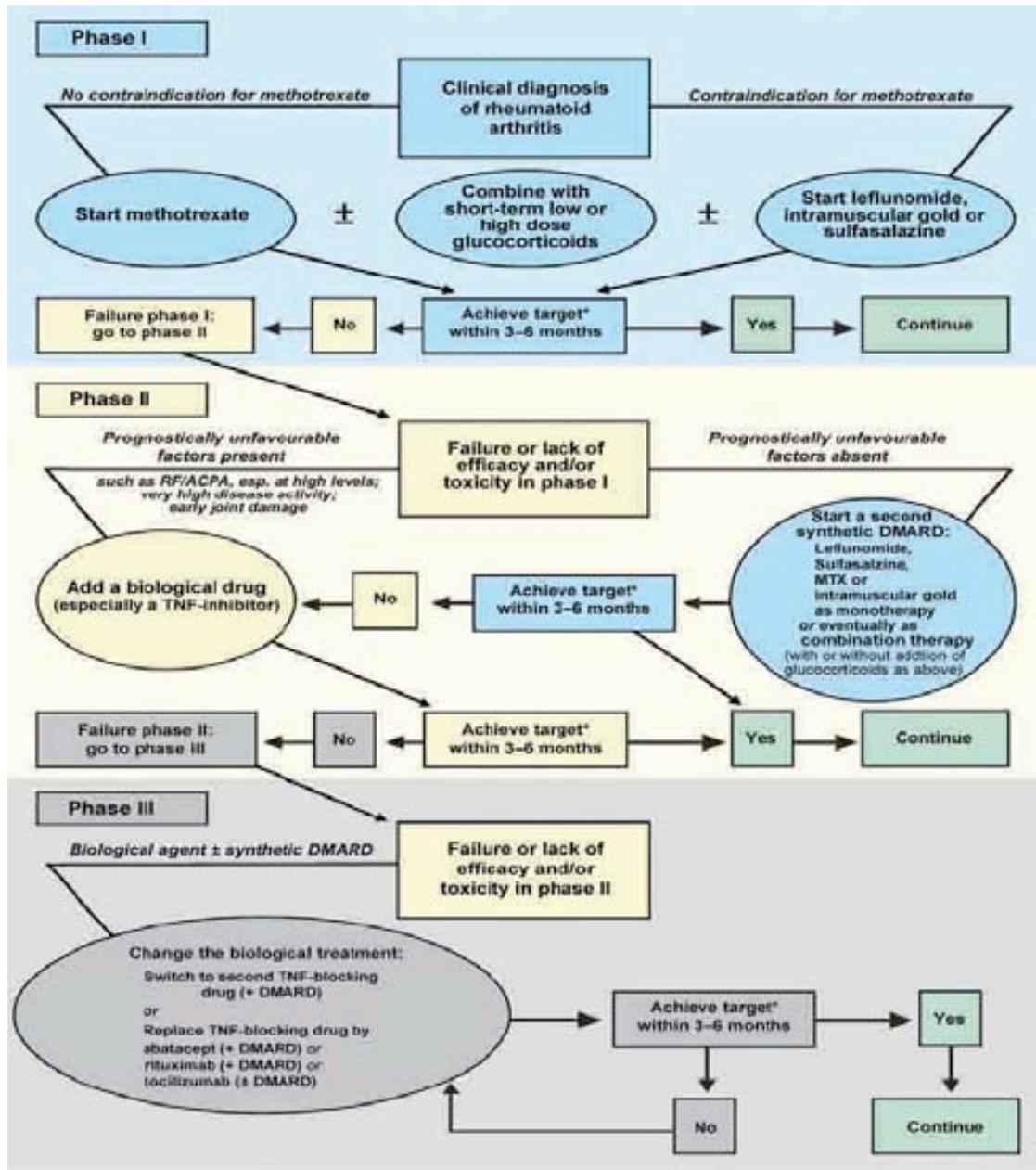
- 1) Añadir FAME (especialmente MTX y en escalada rápida de dosis) si no llevaba.
- 2) Si está tratado con infliximab podría valorarse acortar el intervalo entre las infusiones del fármaco.
- 3) Si está en tratamiento con anti-TNF, cambiar a otro anti-TNF o cambiar a otra terapia biológica con otro mecanismo diana.
- 4) En los casos en los que la terapia biológica inicial sea tocilizumab no hay información específica para realizar recomendaciones, pero se cree que no diferirán mucho de las establecidas para los anti-TNF.

En los casos en los que se ha llegado a remisión puede plantearse:

- 1) Mantener y seguir con la dosis habitual.
  - 2) Disminuir la dosis del fármaco, aumentar el intervalo entre dosis o incluso retirarlo.
- Cualquier modificación de la terapia de un paciente en remisión requiere que esta situación clínica se mantenga, aunque por un tiempo aún por definir. Se recomienda reducir o suspender los corticoides antes de modificar la dosis del agente biológico. No se recomienda reducir la dosis de FAME concomitante antes de reducir la dosis del agente biológico.

## Recomendaciones EULAR

En el año 2010 se publicaron las últimas recomendaciones EULAR [106] para el manejo de la AR con FAMEs sintéticos y biológicos. Las recomendaciones, realizadas por expertos europeos y de EEUU, se basaron en la evidencia de revisiones sistemáticas de la literatura. Estas evidencias posteriormente fueron discutidas y resumidas por los expertos utilizando un proceso Delphi. Finalmente se realizaron 15 recomendaciones que se resumen en la siguiente figura.



\* The treatment target is clinical remission or, if remission is unlikely to be achievable, at least low disease activity

Figura 3. Recomendaciones EULAR para el tratamiento de la AR. Figura obtenida del apartado de recomendaciones de la página web de EULAR: [www.eular.org](http://www.eular.org)

## Recomendaciones ACR

La ACR publicó en el 2012 su última actualización para el tratamiento de la AR con FAMEs y terapias biológicas. Estas recomendaciones presentan diferencias con las europeas. La principal es la distinción entre la AR temprana (<6 meses de evolución) y la AR establecida, presentando estrategias terapéuticas ligeramente distintas. Las principales diferencias con las recomendaciones EULAR son:

### **-AR temprana:**

-En enfermos con factores de mal pronóstico y actividad moderada/alta se recomienda iniciar el tratamiento con terapia combinada con dos FAMEs.

-En los casos que presenten de factores de mal pronóstico y alta actividad de la enfermedad podría también iniciarse terapia anti-TNF.

### **-AR establecida:**

-En los casos de AR con baja actividad y sin factores de mal pronóstico se iniciará tratamiento con FAME en monoterapia, en caso contrario podrá iniciarse tratamiento con FAMEs en monoterapia o combinados.

-Si en 3 meses no se consigue el objetivo terapéutico, deberá plantearse cambiar o añadir otro FAME. En los casos con factores de mal pronóstico o actividad moderada o alta inicial, podrá plantearse también el tratamiento con anti-TNF, abatacept o RTX.

-Si el enfermo está en tratamiento con terapia anti-TNF y presenta un efecto adverso grave se cambiará a una terapia biológica no anti-TNF.

-Se contraindican:

-Cualquier terapia biológica en caso de hepatitis B o hepatopatía crónica con un Child-Pugh clase B o superior.

-Los anti-TNF en caso de insuficiencia cardíaca con grado funcional III/IV según la New York Heart Association (NYHA).

-Se recomienda:

-El uso de etanercept en caso de hepatitis C.

-El uso de rituximab en: a) en casos con antecedentes de neoplasia sólida o neoplasia de piel no melanoma tratados, durante los 5 primeros años post tratamiento, y b) en casos de antecedentes de melanoma o neoplasia linfoproliferativa.

Estas recomendaciones han recibido grandes críticas al no introducir la terapia con glucocorticoides (GC), pero definen mejor las situaciones clínicas [107-109].

### **6.7.3 Terapia farmacológica**

#### **Antiinflamatorios**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COXIBs) mejoran los síntomas y signos de la AR, pero no modifican la progresión radiológica, por lo que no se consideran FAMEs.

Los antiinflamatorios inhiben a la ciclooxigenasa (COX), inhibiendo así el paso de ácido araquidónico a prostaglandina (PG) G<sub>2</sub>. Existen dos isoformas de COX. La COX-1, presente en múltiples tejidos y que regula procesos fisiológicos del organismo, y la COX-2, indetectable en la mayoría de tejidos y que aumenta en los procesos inflamatorios. La aparición de los COXIBs, inhibidores selectivos de la COX-2, ha permitido disminuir los efectos secundarios gastrointestinales, pero no los cardiovasculares. En la AR el uso de AINEs está indicado al inicio del tratamiento como tratamiento sintomático, mientras esperamos a que el FAME sea efectivo.

#### **Corticoides**

Los GC tienen múltiples efectos sobre las vías de la inmunidad y la inflamación.

Al ser muy lipofílicas difunden fácilmente a través de la membrana celular para unirse a los receptores intracelulares. El complejo GC-receptor pasa al interior del núcleo donde puede interactuar directamente con determinadas secuencias del ADN (llamadas elementos que responden a glucocorticoides; GRE) entre otros, esta es la llamada vía genómica. Se unen y bloquean genes proinflamatorios como la IL-1 alfa y beta [110]. Los GC inhiben la síntesis prácticamente de todas las citoquinas (p.e IL-1, IL-6, IL-10, TNF...). Para conseguirlo bloquean la función de factores de transcripción, del NF-KB y del activador protein-1 (AP-1) que son necesarios para la transcripción de los mediadores proinflamatorios [111-113]. Cuando se utilizan dosis medias o altas de corticoides, la vía genómica queda saturada y los GC actúan también a través de hipotéticos receptores de membrana o vía interacciones inespecíficas [114]

Además, los GC disminuyen la capacidad de los leucocitos para unirse al endotelio, salir del torrente sanguíneo y migrar a la zona inflamada. Los GC disminuyen la producción por parte de los macrófagos de citoquinas inflamatorias y eicosanoides [115] y disminuyen su capacidad de presentación de antígenos vía HLA-II [116].

También provocan una depleción de las células T circulantes y de las citoquinas producidas por ellos, tanto las de Th1 como las de Th2. Como el efecto inhibitorio final

sobre las citoquinas Th1 es mayor, al final los GC se asocian a un aumento relativo de las citoquinas Th2 sobre las citoquinas Th1 [117].

Las células B también se reducen con el tratamiento con GC, pero en menor medida que el compartimento T [118]. Inicialmente no producen una disminución de Igs, pero si el tratamiento con GC se alarga años puede haber un descenso de IgG e IgA.

Los GC han demostrado ser eficaces en múltiples ocasiones. Se pueden utilizar a dosis bajas y por poco tiempo, mientras esperamos que los FAMEs actúen [119]. En pacientes con AR precoz los tratamientos con dosis altas de prednisona (60 mg/día), con una disminución rápida hasta su retirada son capaces de inhibir la progresión radiológica [120]. El uso crónico de GC también es eficaz, aunque el riesgo de padecer efectos secundarios aumenta con el tiempo [121].

## **Fármacos modificadores de la enfermedad**

### **Metotrexato**

El MTX es considerado el FAME de referencia para el tratamiento de la AR. Debe formar parte de la terapéutica inicial en los pacientes con AR activa. Es un fármaco que ha demostrado ser más eficaz que los otros FAMEs, con la excepción de LEF [122].

El MTX es un análogo estructural del ácido fólico, puede inhibir de manera competitiva la unión del ácido dihidrofólico a la dihidrofolatoreductasa, impidiendo así que pase a ácido folínico, el metabolito intracelular activo. A pesar de conocerse bien la acción celular del MTX, los mecanismos de cómo mejora la sintomatología en los enfermos con AR no están claros.

Se postula la posibilidad de que el efecto del MTX se deba a un aumento de la concentración extracelular de adenosina, que tiene propiedades antiinflamatorias [123]. Otras posibilidades son la inhibición de la producción de citoquinas por monocitos o linfocitos T activados [124], la supresión de la activación de las células T junto a una disminución de la expresión sus moléculas de adhesión [125] o la delección clonal o apoptosis de células T activadas [126].

La eficacia clínica de MTX se ha demostrado en diversos ensayos clínicos y estudios observacionales. MTX ha demostrado además de eficacia clínica, frenar la progresión radiológica y aumentar la supervivencia, especialmente al disminuir la mortalidad cardiovascular [127].

Tanto en los primeros ensayos clínicos como en la práctica clínica habitual, históricamente la dosis usada de MTX era de 7,5 mg/semana. Con el tiempo, la dosis de MTX se ha ido aumentando hasta 25-30 mg/semanales. Hay diversos estudios que demuestran que MTX puede combinarse con ciclosporina, SSZ, hidroxicloroquina, LEF y todas las terapias biológicas disponibles hasta el momento.

Los efectos secundarios más frecuentes son los gastrointestinales (estomatitis, náuseas,...), sistémicos (malestar general, cansancio...) y hepáticos (aumento de los niveles de las transaminasas). El MTX puede producir también toxicidad de la médula ósea. Se debe evitar el tratamiento con MTX en enfermos con nódulos reumatoides y enfermedad intersticial pulmonar. Todos los pacientes tratados con MTX deben tomar complementos de ácido fólico o folínico para prevenir efectos secundarios.

### **Leflunomida**

La teriflunomida, forma activa de la LEF inhibe la síntesis de una pirimidina, llamada ribonucleótido uridina monofosfato, a través de la inhibición de la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa. La inhibición de este enzima inhabilita en las células activadas el paso de la fase G1 a la fase S, activando así la vía p52 para la selección apoptótica [128].

La LEF ha demostrado ser más eficaz que el placebo y tan eficaz como el MTX a dosis de hasta 15 mg/semanales. En los ensayos clínicos iniciales se observaron más abandonos con leflunomida que con MTX, aunque probablemente fuera debido a las molestias producidas por la dosis de carga de 100 mg/día durante 3 días, que se utilizó en estos ensayos [129,130]. La LEF se ha utilizado en combinación con MTX o SSZ con resultados mejores al tratamiento en monoterapia.

Los efectos adversos más frecuentes son los gastrointestinales (náuseas y diarreas), respiratorios (infecciones de las vías aéreas superiores), hipertensión y cefalea. En un 5% de los pacientes tratados con LEF se observa un aumento de los enzimas hepáticos. También debe vigilarse la posible supresión de la médula ósea [131].

## **Salazopyrina**

La SSZ fue sintetizada por primera vez hace unos 70 años al creerse que la artritis reumatoide tenía una causa infecciosa. Se observó una mejoría clínica en el 60% de pacientes con poliartritis crónica y, también, buena respuesta en la espondilitis anquilosante [132].

El mecanismo de acción de la sulfapiridina no es conocido. Inicialmente se creyó que era por su efecto antibiótico, pero otras sulfamidas no han sido efectivas. La SSZ reduce la IL-1, la IL-6, IL-8 y el TNF, aunque no se sabe si estos efectos son primarios o secundarios a la mejoría de la enfermedad.

La eficacia clínica de la SSZ en monoterapia ha quedado demostrada en múltiples ensayos clínicos [133]. Resulta más difícil contestar si la SSZ es mejor o peor que otros FAMES, pero si MTX es usado como primera línea de tratamiento es porque tiene un mejor ratio beneficio/toxicidad. La SSZ como mínimo es tan efectiva como el oro intramuscular o la D-penicilamina y más efectiva que la hidroxicloroquina, el oro vía oral o la azatioprina.

SSZ ha demostrado aumentar su eficacia al combinarse con MTX y en la triple terapia (MTX + SSZ + hidroxicloroquina). En cambio la SSZ no debe combinarse con etanercept ya que se ha observado una mayor neutropenia al combinarlos que cuando se usan ambos fármacos por separado.

La mayoría de los acontecimientos adversos se observan durante los 3 primeros meses. Los más frecuentes son náuseas, dispepsia, malestar general, aparición de exantemas y efectos neurológicos (cefalea, fiebre, aturdimiento o mareos).

## **Sales de oro**

En 1929, Forestier fue el primero en usar oro como tratamiento de la AR [134]. Posteriormente, diversos ensayos clínicos acabaron de demostrar su eficacia [135]. A partir de los 90, por el aumento del uso de MTX, disminuyó su uso.

A pesar de la amplia experiencia clínica existente con el oro, sus mecanismos de acción no son bien conocidos. Los estudios con sinovectomías han demostrado la acumulación selectiva del oro en los macrófagos sinoviales de las articulaciones

inflamadas. Experimentos in vitro han demostrado que el oro reduce las propiedades angiogénicas de los macrófagos [136]. También se ha demostrado in vitro que los componentes del oro pueden disociar los péptidos antigénicos del HLA-II en el caso del HLA DRB1. El oro intramuscular ha demostrado que puede bloquear los genes de PGE2 y otros genes proinflamatorios [137].

Es mejor usar el oro en AR temprana, no erosiva, progresiva y poliarticular, aunque también se ha utilizado en la AR monoarticular y en el reumatismo palindrómico.

Los datos sobre si el oro es un verdadero FAME y frena la progresión de la enfermedad son controvertidos [138].

### **Antimaláricos**

Los fármacos antipalúdicos se obtuvieron hace siglos del árbol peruano cinchona, y sus agentes activos fueron aislados a principios del siglo XIX. Actualmente, como tratamiento de la AR se utilizan la cloroquina y, sobre todo, la hidroxicloroquina.

Se postulan varios mecanismos de acción de estos fármacos en la AR. Por un lado que al ser bases débiles, pueden entrar en distintos compartimentos celulares (donde primero se descubrió fue en los lisosomas, por ello se llama acción lisosomotrópica) donde aumentan el pH e interfieren en la acción de las hidrolasas ácidas. Esto dificulta el procesamiento de los péptidos antigénicos, el procesamiento intracelular y la secreción de proteínas con lo que hay una disminución de secreción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios [139,140].

Los antimaláricos han demostrado, por otro lado, una acción bloqueadora sobre las vías mediadas por TLR-3, TLR-7 y TLR-9 [141]. Se ha observado también que estos fármacos pueden inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos humanos estimulados en cultivos e inhiben también la acción de las células NK tanto in vitro como in vivo. La cloroquina y la hidroxicloroquina bloquean in vitro la producción de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e INF- $\beta$  [142,143].

La eficacia de los antimaláricos se ha demostrado en múltiples ensayos clínicos, aunque no se ha demostrado que frenen el daño radiológico. Se utilizan en AR leve o moderada y funcionan mejor si el tratamiento se instaura precozmente [99].

## **Terapia combinada en la artritis reumatoide**

La terapia combinada de dos o más FAMEs puede darse en los casos en los que ha sido ineficaz el tratamiento con un único FAME o en casos en que la enfermedad debute con gran actividad o tenga factores de mal pronóstico.

La combinación de MTX (7,5-17,5 mg/semana), hidroxicloroquina (200 mg/día) y SSZ (1-2 gr/día) es la llamada triple terapia. La triple terapia ha demostrado una mayor eficacia que los fármacos en monoterapia, o las combinaciones dobles de sus miembros sin prácticamente alterar el perfil de seguridad [144,145]. El MTX y la LEF han demostrado ser los FAMEs más eficaces. Añadir LEF a enfermos que no responden a MTX ha demostrado aumentar la eficacia [146]. En estos enfermos deberá monitorizarse estrictamente la función hepática e ir ajustando la dosis. El MTX se ha combinado con otros fármacos, pero los resultados o los estudios han sido menos concluyentes o han existido más efectos secundarios.

## **Terapias biológicas**

Al final de la década de los 90 los avances en biología molecular permitieron diseñar tratamientos dirigidos específicamente contra componentes de la cadena inflamatoria y empezaron a aparecer las terapias biológicas. La aparición de estos fármacos ha cambiado radicalmente el pronóstico de los enfermos con AR por diversos motivos, por una parte por su gran eficacia, por otro lado por habernos permitido estudiar mejor la fisiopatogenia de la enfermedad y también por enseñarnos a utilizar de manera más efectiva a los FAMEs clásicos.

Actualmente existen tres tipos de terapias biológicas según su diana terapéutica, aunque se está investigando y avanzando en el desarrollo de otros fármacos con otros mecanismos de acción.

Los existentes hasta el momento son:

- Terapias que actúan sobre citoquinas (TNF, IL-1 e IL-6).
- Terapias que inhiben la “segunda señal” o coestimulación necesaria para activar al linfocito T (CD80/86).
- Terapias que provocan depleción de una subpoblación celular al unirse a antígenos específicos de membrana (CD20).

## Anakinra

Anakinra es una proteína humana recombinante antagonista del receptor de la IL-1. Se diferencia de la IL-1Ra nativa humana en que no está glicosilada y tiene una metionina adicional en el extremo N-terminal. Anakinra se une de manera competitiva al receptor de la IL-1.

Anakinra ha demostrado ser más eficaz que placebo, pero tiene una eficacia limitada e inferior a las otras terapias biológicas, por lo que en la actualidad tiene un uso marginal en la práctica clínica habitual en enfermos con AR [147,148].

## Terapias anti-TNF

Las terapias anti-TNF usadas en monoterapia han demostrado una eficacia clínica similar al metotrexato, aunque la combinación de ambas es superior a cualquiera de las dos solas. En general se ha observado que los anti-TNF son más efectivos en detener la progresión radiológica de la AR en comparación con el metotrexato [149].

Se han aprobado hasta la actualidad cinco inhibidores del TNF (tabla 5):

Tabla 5. **Fármacos inhibidores del TNF aprobados hasta la actualidad**

|                    |   |
|--------------------|---|
| Etanercept         | Proteína de fusión humana dimérica. Consta de un dominio extracelular soluble del receptor de TNF (p75/TNFR2) unido al Fc de la IgG1 humana. Se une al TNF circulante inhibiendo su actividad biológica, pero no afecta al TNF de membrana.   |
| Infliximab         | Anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico. El dominio constante Fc es humano mientras que los dominios variables VK y VH, que son los que se unen al TNF, son murinos. Infliximab se une específicamente al TNF e inhibe la actividad biológica del TNF circulante y puede lisar las células que lo expresan en su superficie. |
| Adalimumab         | Anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humanizado contra el TNF $\alpha$ . Se une tanto al TNF circulante como al que se expresa en la membrana celular. Por este motivo puede inhibir al TNF libre y lisar las células que lo expresan.  |
| Golimumab          | Anticuerpo monoclonal humano IgG1 contra el TNF.  |
| Certolizumab pegol | Compuesto por una región Fab' de un anticuerpo humanizado contra el TNF y está conjugado con polietilenglicol. Actúa tanto sobre el TNF circulante como el presentado en membrana.  |

No existen estudios comparativos entre los distintos anti-TNF, por lo que es difícil evaluar cual es más eficaz o cual es más seguro. Por este motivo se han realizado diversas revisiones sistemáticas y metaanálisis. Actualmente, no puede decirse claramente que haya un anti-TNF superior, aunque estos estudios indican que infliximab y golimumab serían algo inferiores que el resto.

Al comparar los efectos adversos los resultados sugieren que etanercept sería la alternativa más segura [150].

En general, el efecto secundario más frecuente de las terapias biológicas son las reacciones infusionales o las reacciones locales en el punto de inyección subcutánea. Los efectos secundarios de los fármacos anti-TNF pueden ser potencialmente graves, pero deben contextualizarse, ya que el proceso inflamatorio crónico que representa la AR y los otros fármacos que se suelen administrar conjuntamente (como corticoides, metotrexato o leflunomida) pueden ser causa también de complicaciones graves.

Al ser fármacos inmunosupresores aumentan la incidencia de infecciones y la gravedad de las mismas y aunque hay datos contradictorios, la mayoría de los estudios van en este sentido [151-153].

De la misma manera, la inhibición del TNF debería reducir la capacidad de inmunosupervisión sobre las células oncogénicas aumentando el riesgo de aparición de neoplasias. Sin embargo, el mayor metaanálisis existente hasta el momento no encontró un aumento estadísticamente significativo (OR, 1.27 95%CI[0.82-1.98]) tras los dos primeros años de tratamiento. En el caso del cáncer de piel no melanoma se encontró una tendencia más clara, aunque no significativa con el tratamiento con anti-TNF (OR, 1,90 95%CI[0.98-3.67]) [154].

Se han descrito casos de insuficiencia cardíaca, psoriasis cutánea, enfermedad desmielinizante, neuropatía periférica o fibrosis pulmonar.

Es posible también la aparición de anticuerpos anti-antiTNF. Son especialmente importantes en el caso de infliximab, ya que la aparición de anticuerpos antiinfiximab se relaciona además de con la pérdida de respuesta y con la aparición de reacciones infusionales [155].

## **Abatacept**

Abatacept (CTL4-Ig) es una proteína de fusión soluble formada por el dominio extracelular de CTL4 y la porción Fc de IgG1. CTL4 es un receptor que al unirse al CD80 (B7-1) o al CD86 (B7-2) inhibe al linfocito T. CTL4 compite con el CD28, que es el receptor activador.

Abatacept ha demostrado su eficacia en diversos escenarios: en AR precoz sin tratamiento previo con MTX y factores de mal pronóstico, a fallo de tratamiento con MTX y a fallo de terapia anti-TNF [49].

En los pacientes tratados con abatacept se ha observado un aumento de las infecciones serias (especialmente pulmonares), aunque menos que en otras terapias biológicas. En los enfermos que han participado en los ensayos clínicos no se ha observado un aumento de frecuencia en la aparición de neoplasias [156].

## **Tocilizumab**

Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo humanizado de la clase IgG1 contra el receptor de la IL-6. TCZ puede unirse tanto al receptor soluble de IL-6 como al transmembrana.

A parte de la acción directa del bloqueo de la IL-6 sobre los reactantes de fase aguda y otros elementos de la inflamación crónica, se ha visto que la inhibición de la IL-6 provoca un aumento de las células Treg en sangre periférica con un aumento del ratio Treg/Th17 [157], así como un aumento de células B reguladoras [158]. A parte de disminuir el número de neutrófilos y plaquetas, se ha observado que TCZ al contrario de lo que ocurre con el bloqueo del TNF, disminuye las células dendríticas mieloides y los monocitos [159]. Además, TCZ mejora la ratio osteoprotegerina/RANKL y disminuye los niveles de esclerostina [160].

TCZ tiene indicación de tratamiento en enfermos con una AR activa de moderada a grave que han presentado respuesta insuficiente o han intolerado el tratamiento con FAMEs o con anti-TNF. TCZ es el primer fármaco biológico que ha demostrado una eficacia superior a MTX [161]. TCZ en monoterapia ha demostrado ser superior a adalimumab en monoterapia en el primer ensayo clínico directo ente biológicos realizado [162]. En un ensayo clínico que comparó TCZ y MTX, los efectos secundarios observados no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos (3,8 vs 2,8). Los efectos secundarios más frecuentes fueron una neutropenia reversible y el aumento del colesterol total y de los enzimas hepáticos [161].

## 6.8 Rituximab

### 6.8.1 Introducción

Rituximab es un anticuerpo monoclonal glicosilado quimérico ratón/humano dirigido contra el CD20.

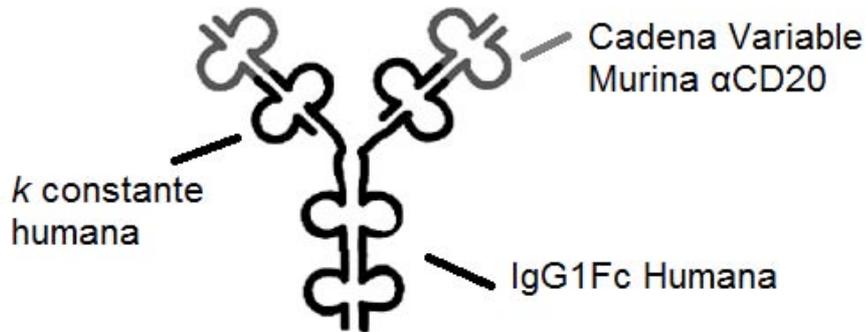


Figura 4. **Estructura quimérica de rituximab.** Las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de la inmunoglobulina son murinas. Están unidas a una cadena pesada IgG1 y a la región constante de una cadena kappa ligera humana. La ventaja de seleccionar una IgG1 es por su habilidad para fijar al complemento y para activar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

CD20 es una proteína que se expresa en la membrana de los linfocitos desde los pre-B hasta los linfocitos B maduros, pero no se expresa ni en las células madre, ni en los linfocitos proB ni en las células plasmáticas. Esta distribución permite a RTX eliminar específicamente las células B, pero también permite su regeneración y la producción de anticuerpos por las células plasmáticas.

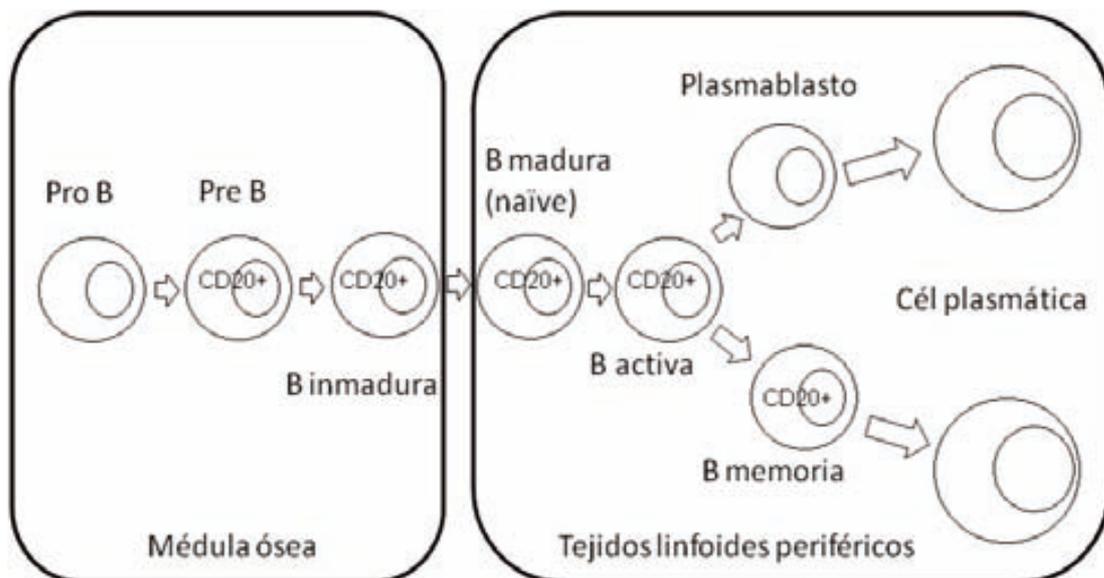


Figura 5. **Maduración y presentación del CD20 en los linfocitos B.**

Se han propuesto distintos mecanismos mediante los cuales rituximab puede lisar las células que presentan CD20 en su superficie. RTX podría unirse al dominio extracelular de CD20, activando al complemento que lisaría la célula.

También se ha propuesto que se trate de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Finalmente también se ha postulado que RTX podría alterar la capacidad de las células B para responder a antígenos u otros estímulos y esto provocaría que la célula iniciara una autólisis programada [163].

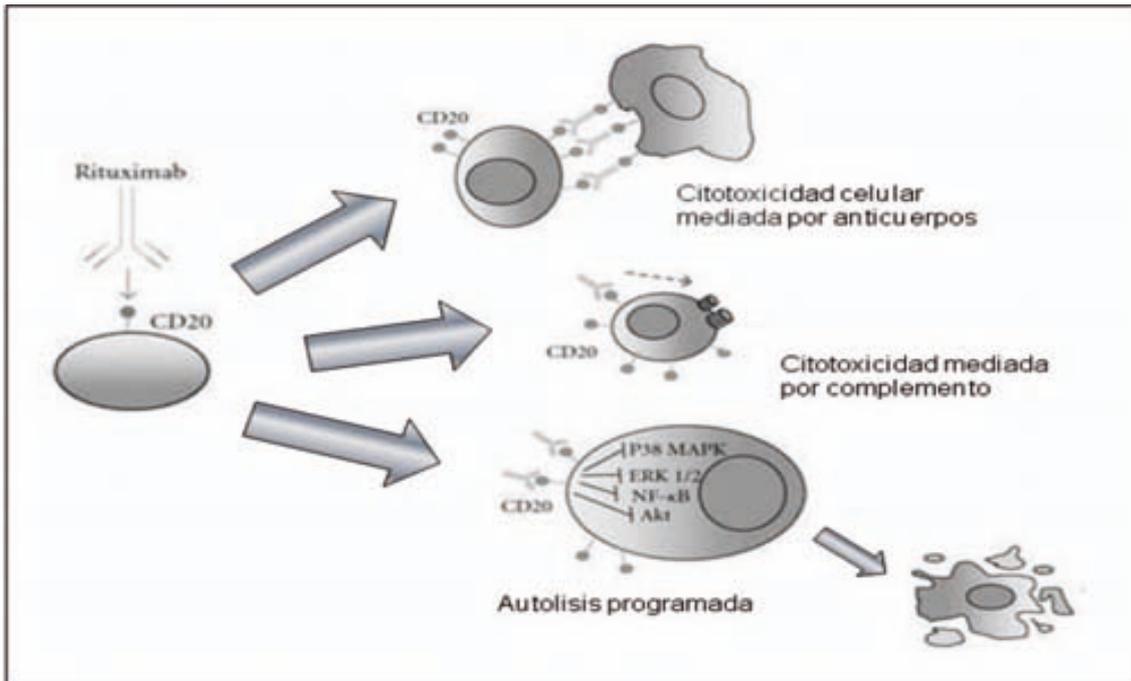


Figura 6. **Mecanismos de acción de rituximab.**

No se conoce exactamente la función del CD20. Tampoco se le conoce un ligando. En ratones knock-out CD20 hay un normal desarrollo y expresión de los linfocitos B. En cambio en los humanos con deficiencia de CD20 se observa una alteración de la respuesta de las células T independiente de antígenos [56].

El CD20 tiene diversas ventajas como objetivo de los anticuerpos monoclonales:

- Se expresa en la membrana celular en niveles altos.
- No se interioriza después de unirse el anticuerpo, por lo que da más tiempo para actuar tanto al complemento como a otras células.
- La parte extracelular de la proteína es corta, lo que permite al anticuerpo estar más cerca de la célula facilitando así las funciones líticas del complemento.

Todo ello permite al anticuerpo monoclonal organizar un ataque persistente tanto del complemento como a través del receptor Fc.

La unión al CD20, además, puede generar señales transmembrana y desencadenar la muerte celular [164].

En estudios preclínicos con ratones y monos se observó que la eficacia y el mecanismo de depleción de células B varían según los distintos animales y según el tejido afecto [165,166].

### **6.8.2 Cambios secundarios al tratamiento con rituximab en el sistema inmune en pacientes con artritis reumatoide**

Rituximab empezó a utilizarse en neoplasias de células B, y posteriormente empezó a usarse en diversas enfermedades autoinmunes [167]. En el año 2001 se publicaron los primeros casos de AR tratados con rituximab [168]. El tratamiento con RTX provoca una rápida, prolongada y prácticamente completa depleción de las células B circulantes. Después, entre los 4 y 12 meses, las células B vuelven a reaparecer. Los patrones de reaparición nos permitirán definir la efectividad del fármaco [169,170].

Se ha descrito que tras el tratamiento primero reaparecen las células B inmaduras, después las células B naïve y finalmente las células B de memoria. Pueden persistir algunas células B, la mayoría de las cuales son precursoras de células plasmáticas CD20 negativas. Esta reaparición se asocia a un porcentaje más elevado de células B de memoria antes del tratamiento y entre las células que repoblarán la sangre después [169].

A pesar de la clara depleción de células B en sangre periférica observada con RTX, no ocurre lo mismo en los tejidos linfoides. En un reciente estudio de 8 pacientes tratados con rituximab se observó que a pesar de conseguirse la depleción periférica de células B, en la médula ósea solo se produjo un descenso que no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, sí que se observó, una reducción estadísticamente significativa de las células B activadas (CD19HLADR+) [171]. Otros dos estudios confirmaron la depleción incompleta de células B en la médula ósea. Además en estos tres estudios citados, se observó que la mejor respuesta clínica se asocia sobre todo a una mayor disminución inicial de las células B de memoria [172,173]. Con la repetición de los ciclos de RTX, el número de células B de memoria disminuye y el de células B inmaduras aumenta progresivamente [173].

Aunque en pacientes con AR se desconocen los efectos de RTX a nivel del bazo o ganglios linfáticos, en enfermos con linfoma no Hodgkin se ha observado una depleción completa a nivel esplénico e incompleta en los ganglios linfáticos [174].

A nivel del tejido sinovial la depleción de células B es significativa pero variable. Hay resultados contradictorios respecto a la relación entre la disminución de las células B en la sinovia y la respuesta clínica. A pesar de ello se ha observado, que en la sinovia, rituximab podría provocar una disminución de células plasmáticas, células dendríticas foliculares y de células T [175-178], además de alterar los agregados sinoviales [179]. Tras el tratamiento con rituximab se ha observado también una disminución de la IgG y la IgM sinovial, sin que esto suponga una disminución de los niveles sinoviales de FR-IgM y aCCP-IgG. Parece como si las células productoras de autoanticuerpos estuvieran más protegidas del anti-CD20 que el resto. De todas formas, la pérdida de estas células plasmáticas favorecería la disminución de inmunocomplejos que contuvieran Ig y productos del complemento con capacidad para activar a los sinoviocitos tipo A [175].

Se observó también una disminución en la expresión de los genes de células T y B en tejido sinovial tras el tratamiento con RTX. Esta disminución no se observó en otros tipos celulares [180].

La resistencia que presentan las células B a la terapia anti-CD20 en los distintos tejidos es probablemente secundaria al contacto de estas células con factores, tanto solubles como por señalización transmembrana, que favorecen la supervivencia de las mismas. Se conocen varios de estos factores, y entre ellos destacan, el BAFF (B-cell activation factor), el APRIL (a proliferation inducing ligand), el factor inhibidor de la migración de los macrófagos, el CXCL12, el CXCL13, el CCL21 y el CCR7 [181].

En suero RTX disminuye los niveles de inmunoglobulinas, pero a pesar de esta disminución estas suelen persistir dentro de los límites de la normalidad. Hay estudios que demuestran que el FR y los a-CCP disminuyen significativamente más que las inmunoglobulinas. Por otro lado se observó también que los niveles de anticuerpos antimicrobianos (tétanos y neumococo) prácticamente no se modificaron [182].

En un estudio de 12 pacientes en el que se obtienen muestras de tejido sinovial al inicio y a las 12 semanas después del tratamiento con RTX, se observó una disminución de las células Th17, de los niveles de mRNA de IL-17a, IL-21 e IL22 (citoquinas típicamente producidas por la célula Th17) y de ROR- $\gamma$ t (retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t) (que participa en la supervivencia de las células Th17). En cambio no se encontraron diferencias ni en el número de células T, ni en la inmunotinción con GARP (glycoprotein A repetitions predominant) que se expresa en las células Treg activadas, ni en la expresión de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

Por todo esto, los autores sugirieron que el efecto terapéutico de rituximab se da en parte por la disminución de la respuesta Th17 debida a la depleción de las células B. Para acabar de demostrarlo, presentaron un experimento in vitro. RTX consiguió disminuir la producción de IL-17 e IL-22. En cambio, en monocitos extraídos de enfermos con agammaglobulinemia ligada al X, que son enfermos que no tienen linfocitos B circulantes funcionales, la presencia de RTX no alteró la producción de IL-17 [178].

Cabe destacar que los mismos autores no consiguieron los mismos resultados en 13 enfermos trasplantados renales a los que se administraron dosis bajas de RTX [183].

En otro estudio en el que se trató con RTX a 18 enfermos con AR seropositiva en los que había fracasado el tratamiento con al menos un FAME y un anti-TNF se observó que un mes después del tratamiento, a parte de la depleción de células B, había una disminución de las células CD3+CD8+ y una aumento de las CD56+CD16+CD54brighth (células NK activadas). Además la variación de estas células NK activadas se correlacionaba con los cambios clínicos medidos por DAS28 [184].

Se discute también la posibilidad de la existencia de un subgrupo de linfocitos T CD20+ con capacidad proinflamatoria, que también podrían ser lisados por RTX. Si así fuera, este sería un mecanismo adicional de actuación del fármaco [185,186].

Es difícil deducir la relevancia que tiene la premedicación parenteral con dosis altas de corticoides en estos cambios ya que no hay estudios al respecto. Hay información de un ensayo con otro fármaco anti-CD20 con características in vitro parecidas a RTX (ocrelizumab), en el que solo se permitían bajas dosis de corticoides. Con este fármaco la lenta respuesta clínica e histopatológica es parecida a la de rituximab [187].

Además de la buena respuesta clínica RTX es capaz de inhibir la destrucción articular provocada por la AR [188]. Esta acción viene determinada por una disminución de los precursores de osteoclastos RANK+ y una disminución de la expresión de RANKL, así como un aumento de la ratio osteoprotegerina/RANKL [189]. En ensayos clínicos se ha demostrado que en un pequeño porcentaje (5-10%) de enfermos pueden aparecer anticuerpos antirituximab, aunque no se les ha encontrado repercusión clínica [190].

### 6.8.3 Eficacia

Los primeros estudios publicados en los que se utilizó RTX como terapia para la AR, a pesar de la heterogeneidad de las dosis y combinaciones de fármacos utilizadas, demostraron, de forma común que se trataba de un fármaco eficaz y con un perfil de seguridad adecuado [168,191,192].

Los principales ensayos clínicos se resumen en la tabla 6:

Tabla 6. **Principales ensayos clínicos de rituximab**

| Estudio                | Tipo de paciente     | N   | Ramas  | Resultados más importantes   |
|------------------------|----------------------|-----|--|--|
| Fase IIa [193]         | Fallo MTX            | 161 | 4 ramas: MTX, RTX, MTX+RTX y RTX+CFM                                       | RTX es superior a PBO. RTX + MTX es la mejor combinación.                            |
| DANCER; Fase IIb [190] | Fallo FAME MTX naïve | 465 | PBO o dosis de 500 o 1000 mg de RTX + MTX. Diferentes dosis de corticoides | Grupos con RTX mejor que PBO. La toma de corticoides no mejora la respuesta clínica. |
| REFLEX; Fase III [194] | Fallo anti-TNF       | 512 | 2 ramas: PBO+MTX y RTX (1000 mg)+MTX                                       | RTX+MTX es superior a MTX+PBO. Respuesta EULAR: 65% vs 22%                           |
| SERENE; Fase III [195] | Fallo MTX            | 512 | 3 ramas: PBO+MTX, RTX 500+MTX y RTX 1000 +MTX                              | RTX es superior a PBO. Clínicamente no hay diferencias entre los dos grupos con RTX. |
| IMAGE; Fase III [196]  | MTX naïve            | 755 | 3 ramas: PBO+MTX, RTX 500+MTX y RTX 1000 +MTX                              | Solo RTX 1000 es superior a PBO en el enlentecimiento de la progresión radiográfica. |

Los estudios de extensión han permitido comprobar que tanto la seguridad como la eficacia de rituximab se mantienen después de las distintas infusiones [197-199].

#### **6.8.4 Seguridad**

La rapidez con que RTX deplecciona las células B y la posibilidad de una disminución de las inmunoglobulinas provocó al inicio dudas sobre la seguridad de esta terapia. A pesar de que RTX partía con la ventaja de que era un fármaco que ya había demostrado su seguridad años antes como tratamiento oncológico en más de 350.000 pacientes con linfoma no-Hodgkin, se trataba de enfermedades distintas, y sobre todo de duraciones de tratamiento distintas.

En general y después de años de experiencia RTX ha demostrado ser un fármaco seguro y bien tolerado también como tratamiento de la AR [197,199].

El efecto secundario más frecuente son las reacciones infusionales, estas suelen ser leves y consisten en cefalea, odinofagia, rash cutáneo y febrícula. Se da en un 25-40% de los pacientes. Su incidencia disminuye con la premedicación con antihistamínicos y metilprednisolona. Puede ser grave en menos de un 1% de los casos [193,199].

Posteriormente a los ensayos clínicos se han descrito algunos casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva en enfermos con enfermedad inmunológica tratados con rituximab. Sobre todo se ha dado en pacientes con lupus, AR y pancitopenia y trombopenia idiopática autoinmune. De todas formas, los casos en AR son escasos comparados con los casos hallados en enfermos con lupus [200,201].

#### **6.8.5 Niveles de rituximab**

Existen tres estudios que hayan analizado la relación entre la clínica, la deplección de células B y los niveles y la farmacocinética de rituximab en AR.

En general en todos se observa una gran variabilidad en los niveles de RTX en suero. En ninguno de los estudios se encuentra relación entre la evolución clínica y los niveles de RTX. Solo en un estudio se encuentra relación entre los niveles de RTX y la deplección de células B. La relación es inversa y está estudiada a las 4 y 12 semanas [202].

Tampoco se encuentran diferencias en los niveles de RTX entre enfermos con y sin progresión radiológica y entre los que se consigue o no la deplección sinovial de células B [203,204]. Sólo en uno de los estudios se hallan anticuerpos antirituximab, que se encuentra en un 8,6% de los enfermos. La presencia de antirituximab se relaciona con niveles más bajos de RTX, pero no con la respuesta clínica [203,205,206]

### 6.8.6 Alteraciones provocadas en el sistema inmune en otras conectivopatías tratadas con rituximab

Aparte de en AR, RTX se utiliza en múltiples enfermedades de etiología autoinmune, especialmente en aquellas, como el LES, en las que los autoanticuerpos tienen un rol más importante. Los cambios provocados por RTX en estas enfermedades se enumeran en la siguiente tabla.

Tabla 7. **Cambios en el sistema inmune producidos en otras conectivopatías tratadas con rituximab**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Lupus eritematoso sistémico [207] | Disminución de la expresión de CD40L en las células T CD4+   |
|                                   | Disminución de las células T CD69+   |
|                                   | Disminución de la expresión de HLADR+  |
|                                   | Aumenta la expresión de mRNA de CD25, CTLA-4, GITR y FOXP3   |
|                                   | Disminución de la expresión de CD40L y ICOS en las células CD4+  |
|                                   | No se encontraron cambios en la expresión de células T de HLADR, CD45 RA+ o RO+  |
|                                   | Disminución de inmunoglobulinas específica y no generalizada. Los niveles de IgM, IgE, anti-DNA <sub>dc</sub> y anti-C1q disminuyeron, mientras que los niveles de IgG y anti Ro52, Ro60, La44 e Igs contra el sarampión y el tétanos se mantenían sin cambios |
| S. de Churg-Strauss [208]         | Disminución de IL-5  |
| S. de Sjögren [208,209]           | Disminución de la ratio entre las células T efectoras (CD4+CD127+) respecto a las células T reguladoras (CD4+CD25 <sup>+++</sup> CD127-)   |
|                                   | En glándula salival se observa una disminución de los agregados linfocitarios, de los linfocitos B y T, de la proliferación medida por la expresión de Ki67 y de la ratio de linfocitos B/T  |
| Trombocitopenia autoinmune [210]  | En el grupo tratado con RTX el aumento de las células T reguladoras se mantiene más tiempo que en el grupo tratado solo con corticoides.   |

En general, podemos concluir que rituximab en estas patologías no provoca cambios en los números totales de las células T pero si en sus subtipos, provocando un descenso de las células T activadas y de memoria y un aumento de las células T reguladoras.

## 5. Hipótesis

Los linfocitos B participan en múltiples mecanismos efectores y de regulación del sistema inmune. A parte de ser los responsables finales de la producción de autoanticuerpos, también sintetizan citoquinas y pueden presentar antígenos en el contexto de MHC-II. La depleción de los linfocitos B, por lo tanto, podría inducir una serie de cambios, directos o indirectos, en los otros componentes del sistema inmune.

La IL-15 es una citoquina proinflamatoria de especial relevancia en la AR. Sus niveles en el suero están elevados en la mayoría de los pacientes y se correlacionan con la actividad de la enfermedad. Además la IL-15 puede detectarse en la superficie celular y actuar biológicamente por transpresentación. La principal fuente de IL-15 no son los linfocitos B, pero dada la compleja red de interacciones entre los elementos del sistema inmune, el tratamiento con rituximab podría disminuir de forma indirecta los niveles de IL-15. Si tiene lugar esta disminución, se verán afectados aquellos mecanismos en los que está implicada la IL-15.

En otras terapias biológicas, como los anti-TNF, hay una clara relación entre los niveles del fármaco y la respuesta clínica. En los escasos estudios previos con rituximab, se ha detectado una gran variabilidad en los niveles de rituximab en el suero y no se ha determinado relación entre el fármaco y la actividad clínica. Por el momento, la única relación que se ha podido establecer es entre la actividad clínica y la depleción periférica de linfocitos B. Es probable que los niveles de rituximab en el suero de los pacientes de AR, y tal como se ha visto en pacientes con neoplasias tratado con rituximab, podría condicionar los niveles de depleción de células B, y en consecuencia, la respuesta clínica.



## 6. Objetivos

De acuerdo con las hipótesis propuestas, el objetivo principal es:

-Determinar como la depleción de las células B repercute en los niveles de células T y sus distintas subpoblaciones (células T reguladoras, células T naïve i células T de memoria) y en los niveles de IL-15 en los pacientes con artritis reumatoide tratados con rituximab.

Objetivos secundarios:

-Describir la respuesta clínica de una cohorte de enfermos con AR tratados con rituximab según práctica clínica diaria a lo largo de los tres primeros ciclos de tratamiento.

-Analizar si existe una repuesta clínica o inmunológica distinta entre los pacientes según los niveles de IL-15 en suero.

-Determinar los niveles de rituximab en el suero a distintos tiempos del tratamiento y analizar si hay una relación entre estos niveles y la evolución clínica.

-Determinar los niveles de rituximab en el suero a distintos tiempos del tratamiento y analizar si hay una relación entre estos niveles y la depleción de células B.



## 7. Material y métodos

### 7.1 Pacientes y controles

Se seleccionaron prospectivamente y consecutivamente para participar en el estudio a enfermos con artritis reumatoide activa a los que se había administrado rituximab según práctica clínica habitual entre noviembre del 2006 y diciembre del 2011.

La práctica clínica habitual en nuestro centro se basa en las guías y recomendaciones de la SER y de la EULAR. Básicamente consiste en administrar rituximab a enfermos en los que ha fracasado el tratamiento como mínimo con un FAME (que incluya MTX) y con una terapia anti-TNF.

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestro hospital.

Todos los enfermos que participaron en el estudio firmaron el consentimiento informado.

Inicialmente se seleccionaron 39 enfermos, de los que 33 iniciaron el estudio.

De estos 33 enfermos, 27 recibieron el segundo ciclo de rituximab y 23 el tercero.

Las muestras de sangre de donantes sanos utilizados como controles fueron recogidas de manera aleatoria y anónima. Las muestras se recogieron del Banco de Sangre del Hospital.

Los criterios de inclusión y exclusión en el estudio se exponen en las siguientes tablas:

Tabla 10. **Criterios de inclusión**

|   |
|---|
| -Tener más de 18 años de edad.  |
| -Estar diagnosticado de artritis reumatoide del adulto según los criterios de la ACR de 1987 [87].      |
| -Padecer una enfermedad activa definida por un DAS28>3,2.   |
| -Haber presentado respuesta insuficiente o intolerancia como mínimo a un FAME y a una terapia anti-TNF. |
| -Estar capacitado para leer, entender y firmar el consentimiento informado y que lo hayan hecho.        |

Tabla 11. **Criterios de exclusión**

|  |
|--|
| -Estar recibiendo una dosis de corticoides superiores a prednisona 10 mg/día o su equivalente.   |
| -Padeecer un síndrome de fibromialgia que pueda dificultar la valoración de la actividad de la enfermedad.   |
| -Estar diagnosticado de otra enfermedad inflamatoria sistémica que no sea la AR, como la artritis crónica juvenil, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o las espondiloartropatias. (No se excluyen aquellos pacientes con síndrome de Sjögren secundario). |
| -Presencia de una infección activa o sospecha de la misma.   |
| -Presencia de alguna enfermedad o trastorno cardiovascular, respiratorio, hepático, gastrointestinal, endocrino, hematológico, psiquiátrico o neurológico que dificulte o impida el tratamiento con el fármaco o el seguimiento clínico del mismo.                 |
| -Historia de infección por hepatitis B o VIH.  |
| -Tuberculosis latente no correctamente tratada.  |
| -Pacientes con insuficiencia cardíaca grave (Clase IV de la NYHA) o enfermedades cardíacas graves no controladas.  |
| -Pacientes que hayan recibido anteriormente tratamiento con otras terapias biológicas distintas a anti-TNF o anakinra.   |
| -Pacientes embarazadas o que estén en periodo de lactancia.  |

### **7.1.3 Características del tratamiento**

Los pacientes fueron tratados con dos infusiones de 1000 mg de rituximab separadas por 15 días. Como indica la ficha técnica, y para evitar reacciones relacionadas con la infusión, se realizó tratamiento previo con 1 gr de paracetamol, 100 mg de metilprednisolona y 25 mg de difenidramina.

Los siguientes ciclos de tratamiento se hicieron según la evolución clínica, pero nunca antes de los 6 meses. El seguimiento y control de los pacientes se realizó basalmente y a los 30, 90 y 180 días después de la primera infusión de cada ciclo.

A los pacientes que estaban recibiendo previamente FAME o corticoides se les mantuvo el tratamiento y se les añadió rituximab. Los que no estaban recibiendo tratamiento con FAMEs recibieron rituximab en monoterapia. El uso y dosis de FAMEs y corticoides posterior se realizó según práctica clínica habitual.

### 7.1.4 Recogida de datos

De los pacientes se recogieron datos basales para poder definir a la población estudiada y datos durante el seguimiento para poder analizar los cambios clínicos y de laboratorio tras la depleción de las células B.

-De los participantes en el estudio se recogieron los siguientes datos;

1. Sociodemográficos: edad y sexo.
2. Antecedentes patológicos: alergias medicamentosas, comorbilidades y tratamiento recibido para las mismas.
3. De la AR: años de evolución, presencia de FR y a-CCP, presencia de erosiones, presencia o antecedentes de nódulos reumatoides.
4. Del tratamiento de la AR: nombre y dosis del FAME, corticoide y AINE que tomaba al inicio de la terapia con rituximab y cambios realizados durante el seguimiento. Presencia y descripción de efectos secundarios. Tratamientos previos (FAMEs y terapias biológicas) y motivo del abandono.
5. Clínicos: rigidez matutina (minutos), número de articulaciones dolorosas (NAD) (sobre 28 y sobre 68), número de articulaciones tumefactas (NAT) (sobre 28 y sobre 66), valoración global de la enfermedad y del dolor del paciente en una escala del 0 al 100 utilizando una escala visual analógica (EVA), valoración de la enfermedad del médico utilizando una EVA del 0 al 100 y distintos índices compuestos de actividad de la enfermedad como el DAS28 [95] que se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 12. **Índices compuestos para medir la actividad clínica utilizados en el estudio**

|  |
|--|
| DAS28 = $0,56 \times \sqrt{\text{NAD}(28)} + 0,28 \times \sqrt{\text{NAT}(28)} + \ln(\text{VSG}) + 0,014 \times \text{EVA global}$ . La VSG en mm/h y la EVA global del enfermo en escala de 0 a 100. El recuento de NAD y NAT es sobre 28 articulaciones seleccionadas. |
| SDAI= $\text{NAD}(28) + \text{NAT}(28) + \text{EVA global del enfermo (0-100)} + \text{EVA del médico (0-100)} + \text{PCR (mg/dl)}$   |
| CDAI= $\text{NAD}(28) + \text{NAT}(28) + \text{EVA global del enfermo (0-100)} + \text{EVA del médico (0-100)}$ .  |

La actividad clínica fue clasificada según criterios EULAR, estos criterios se presentan en la tabla 13:

Tabla 13. **Clasificación EULAR de la actividad de la artritis reumatoide según DAS**

| DAS28   | Actividad |
|---------|-----------|
| <2,6    | Remisión  |
| 2,6-3,2 | Baja      |
| 3,2-5,1 | Moderada  |
| ≥5,1    | Alta      |

6. Cuestionarios de capacidad funcional: Healt Assesment Questionnaire

El HAQ es un cuestionario autoadministrado de 20 ítems que evalúa la discapacidad física autopercebida para realizar diversas actividades básicas de la vida diaria agrupadas en: vestirse y asearse, levantarse, comer, caminar y pasear, higiene personal, alcanzar, prensión y otras actividades. El HAQ tiene una puntuación mínima de 0 y una puntuación máxima (que indica máxima limitación en la capacidad funcional) de 3. La traducción del HAQ al español, que es la que hemos utilizado, ya ha sido validada [211,212]. El HAQ es un cuestionario que permite valorar la discapacidad funcional autopercebida. El HAQ ha demostrado ser un test sensible y fiable tanto a nivel individual como de grupo. Su gran defecto es que en múltiples estudios aparece un elevado número de pacientes con un valor de 0. Por este motivo no se consideraría apropiado su uso en poblaciones con una buena capacidad funcional, aunque en nuestro caso ningún paciente tenía un HAQ inicial de 0.

7. Analíticos:

- a. Bioquímica: Ionograma, glicemia y función renal y hepática.
- b. Hemograma: Hemoglobina, neutrófilos y plaquetas.
- c. Reactantes de fase aguda: VSG y PCR.
- d. Inmunológicos: FR, a-CCP, anticuerpos antinucleares (ANAs), inmunoglobulinas, complemento, citometría de flujo y citoquinas.

-Datos de seguimiento:

1. En las visitas de seguimiento se recogieron los mismos datos que en la visita basal excepto los sociodemográficos. Se preguntó por la aparición de efectos secundarios y por cambios en las comorbilidades y el tratamiento de las mismas.

2. Se clasificó a los enfermos según la respuesta al tratamiento siguiendo los criterios EULAR [213]:

Tabla 14. **Criterios EULAR de respuesta al tratamiento**

| DAS28       | Mejoría del DAS28 respecto a la visita basal |                    |              |
|-------------|--|--------------------|--------------|
|             | >1,2   | 0,6-1,2            | ≤0,6         |
| ≤3,2        | Buena respuesta                              | Respuesta moderada | No respuesta |
| 3,2< y ≤5,1 | Respuesta moderada                           | Respuesta moderada | No respuesta |
| >5,1        | Respuesta moderada                           | No respuesta       | No respuesta |

Clasificación de los enfermos en respondedores y no respondedores

Los ciclos de RTX pueden administrarse de manera cíclica cada 6 meses o a demanda dependiendo de la respuesta clínica. Esta característica hace más compleja la definición de respondedor según los criterios EULAR. ¿Es respondedor un enfermo con respuesta a los 3 meses y que la pierde a los 6 meses?, o al revés, ¿es respondedor un enfermo que no consigue la respuesta a los 3 meses, pero si que la consigue a los 6 meses?

Basandonos en los protocolos y guías actuales de manejo de la AR en el que el control rápido y estricto de la clínica inflamatoria es imperativo hemos decidido considerar respondedores solo a los enfermos con una respuesta EULAR moderada/buena tanto a los 3 como a los 6 meses comparado con el tiempo basal.

## **7. 2. Recogida de muestras**

Las muestras se recogieron inmediatamente antes del inicio de la premedicación de la primera infusión de cada ciclo y a los 30, 90 y 180 días después de la primera infusión. De cada enfermo, además de las muestras para el análisis y estudio de bioquímica, hemograma, VSG, PCR, factor reumatoide, a-CCP, ANAs, complemento e inmunoglobulinas siguiendo la rutina estándar del hospital, se recogieron 10 ml extra de sangre en un tubo de heparina litio que se procesaron en las dos horas posteriores a la extracción.

De estos 10 ml se cogía 1 ml y se repartían en 10 tubos de citometría, 100 µl por tubo para su posterior estudio.

Los restantes 9 ml se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y se recogió 1 ml de plasma que se congeló para el posterior estudio de citoquinas.

## **7.3. Citometría de flujo**

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de las células, a medida que son arrastradas de una en una por un flujo portador frente a un sistema de detección. La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares o que modifican propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas.

Mediante la citometría de flujo pueden definirse las características físicas y químicas de las células que se clasifican en parámetros extrínsecos (antígenos de superficie) o intrínsecos (morfología celular, tamaño y rugosidad citoplasmática). Los parámetros Forward Scatter (FS) y Side Scatter (SC) permiten diferenciar las células por su tamaño y rugosidad respectivamente. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas con amplia aplicación en estudios inmunológicos.

En este estudio, de cada muestra se analizaron entre 20.000 y 50.000 eventos.

### 7.3.1. Panel de anticuerpos utilizados para fenotipado de linfocitos

Las características de los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio se detallan en la siguiente tabla, donde además se especifica el fluorocromo y la casa comercial.

Tabla 15. Anticuerpos utilizados para el fenotipado de linfocitos

| Anitcuerpo monoclonal             | Ig                  | Clon         | Fluorocromo                                  | Marca comercial  |
|-----------------------------------|---------------------|--------------|--|--|
| CD45                              | IgG <sub>2b</sub>   | B3821F4A     | Fitc   | Beckman Coulter Cyto-STAT tetrachrome system lymphocyte cocktail |
| CD4                               | IgG <sub>1</sub>    | SFCI12T4D11  | PE   |  |
| CD8                               | IgG <sub>1</sub>    | SFCI21Thy2D3 | ECD  |  |
| CD3                               | IgG <sub>1</sub>    | UCHT1        | PC5  |  |
| CD45                              | IgG <sub>2b</sub>   | B3821F4A     | Fitc   | Beckman Coulter NK Cocktail                                      |
| CD19                              | IgG <sub>1</sub>    | J4.119       | ECD  |  |
| CD3                               | IgG <sub>1</sub>    | UCHT1        | PC5  |  |
| CD56                              | IgG <sub>1</sub>    | N901/NKH-1   | PE   |  |
| CD3                               | IgG <sub>1,κ</sub>  | UCHT1        | PC5  | BD Bioscience  |
| CD4                               | IgG <sub>1,κ</sub>  | SFCI2T4D11   | ECD  | Cyto-Stat/Coulter Clone, Beckman Coulter                         |
| CD4                               | IgG <sub>1,κ</sub>  | RPA-T4       | Fitc   | BD Bioscience  |
| CD4                               | IgG <sub>1,κ</sub>  | SK3          | PCy7   | Biologend  |
| CD10                              | IgG <sub>1</sub>    | HI10a        | PE   | ImmunoTools  |
| CD19                              | IgG <sub>1</sub>    | LT19         | PEDy647                                      | ImmunoTools  |
| CD24                              | IgG <sub>1</sub>    | SN3          | Fitc   | ImmunoTools  |
| CD25                              | IgG <sub>1,κ</sub>  | M-A251       | PE   | BD Bioscience  |
| CD27                              | IgG <sub>2a</sub>   | LT27         | Fitc   | ImmunoTools  |
| CD38                              | IgG <sub>1,κ</sub>  | HIT2         | PE   | ImmunoTools  |
| CD45RA                            | IgG <sub>2b,γ</sub> | HI100        | Fitc   | BD Bioscience  |
| CD45RO                            | IgG <sub>2a,γ</sub> | UCHL1        | PE   | BD Bioscience  |
| CD127                             | IgG <sub>1,κ</sub>  | HIL-7R-M21   | Alexa 647                                    | BD Bioscience  |
| Inmuno-globulinas isotipo control | IgG <sub>1</sub>    |              | PE, ECD, PC5, Fitc, PCy7, PEDy647, Alexa 647 | BD Bioscience  |
|                                   | IgG <sub>2a</sub>   |              | Fitc, PE                                     |  |
|                                   | IgG <sub>2b</sub>   |              | Fitc   |  |

a. Se añadieron 20 microlitros ( $\mu$ l) de cada anticuerpo que compone el cocktail según los tubos:

-Tubo 1: CD45/CD4/CD8/CD3, para determinar los linfocitos T

-Tubo 2: CD45/CD19/CD56/CD3, para determinar las células NK.

-Tubo 3: CD4/CD25/CD127 para determinar las células T reguladoras.

-Tubo 4: CD3/CD4/CD45RA/CD45RO para determinar las células T naïve y de memoria.

b. Los anticuerpos se incubaron entonces durante 15 minutos a temperatura ambiente y a oscuras.

c. Se añadió a cada tubo:

- 500  $\mu$ l de tampón A (1,2 ml de ácido fórmico en 1L de agua destilada) para la lisis de hematíes y fijación celular.

- 300  $\mu$ l de tampón B (6 gr de carbonato sódico, 14,5 g de NaCl, 31,3 g de sulfato sódico en 1L de agua bidestilada) con función estabilizadora.

- 100  $\mu$ l de tampón C (10 gr de formaldehído en 1L de agua bidestilada) con función fijadora.

d. Para el análisis citométrico se utilizó un citómetro Cytomics FC 500 utilizando el software CXP (Beckman Coulter). Primero se seleccionaron los linfocitos por morfología (tamaño y complejidad) celular.

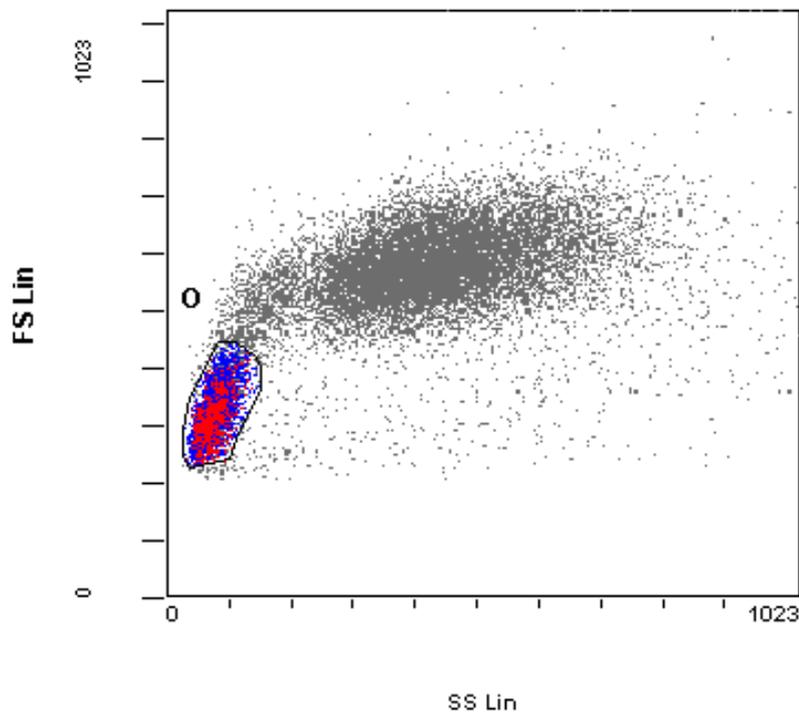


Figura 7. **Selección de linfocitos según morfología celular.** Ejemplo de la selección de linfocitos de un paciente representativo para realizar el análisis citométrico de los mismos. Los linfocitos son de un tamaño y complejidad menor.

e. Se analizaron las células T basandonos en la expresión de CD3 y la proporción de células CD4+ y CD8+.

f. Se analizaron las células B y NK basandonos en la expresión de CD19 y CD56. Las células NK se identificaron como linfocitos CD3- y CD56+. Para identificar a las células B se utilizó la expresión de CD19+. Se evitó la utilización de CD20+ para evitar interferencias con el propio rituximab.

g. Sobre células CD4+ analizamos la proporción de células T reguladoras. Las células T reguladoras se identificaron basandonos en la expresión de CD4, CD25 y CD127. Tras seleccionar las células T CD4+CD25++, se determinó el porcentaje de células CD127-.

h. Finalmente se seleccionaron los linfocitos CD4+ y CD4- (que consideramos CD8+) y sobre ellos se calculó el porcentaje de células CD45RO+ (memoria) y CD45RA+ (naïve).

La tinción inespecífica se determinó con los respectivos isotipos anti-humanos control. Siempre se analizaron un mínimo de 20.000 células mononucleares por tubo.

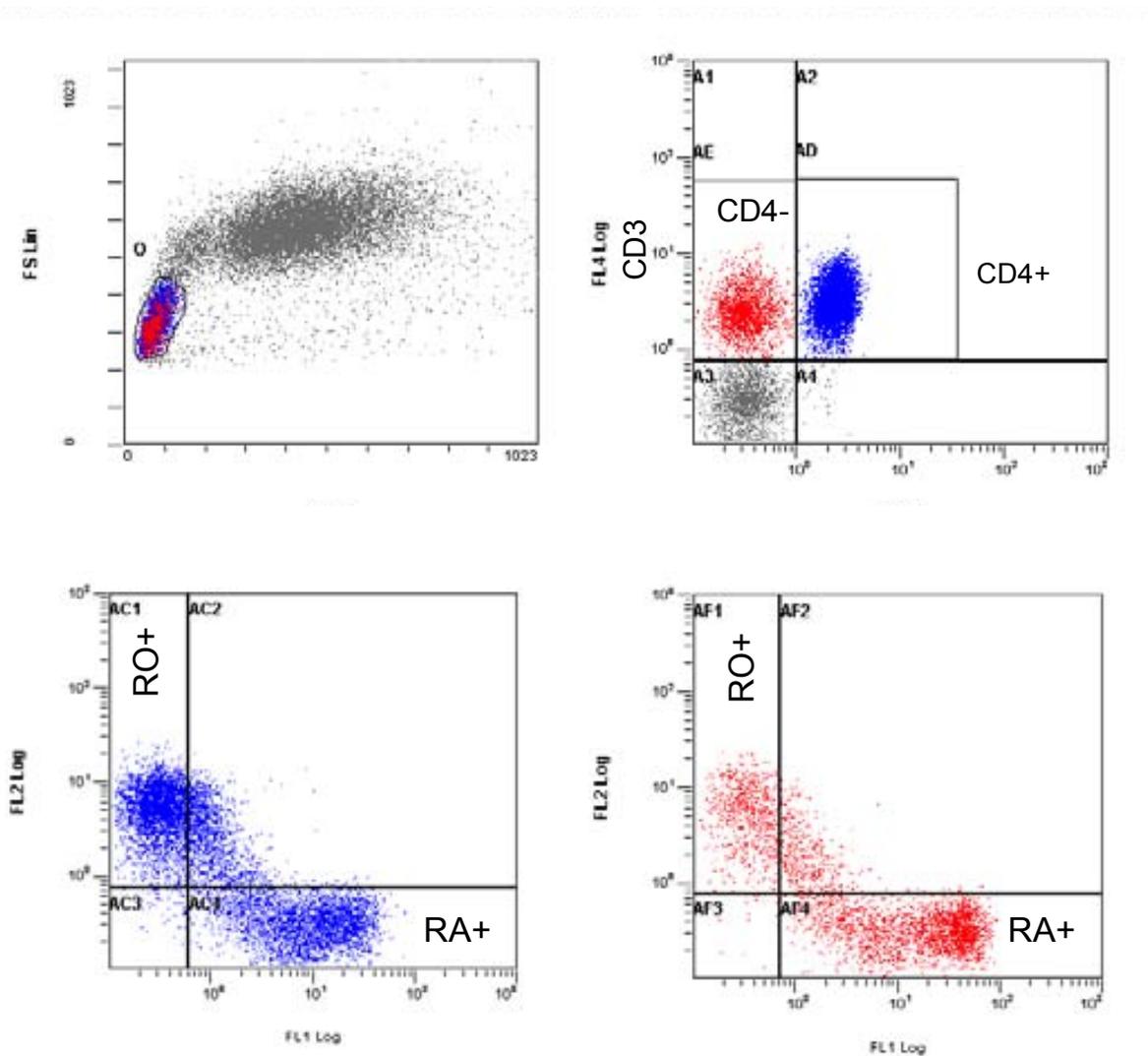


Figura 8. Selección de linfocitos T helper y citotóxicos naïve y de memoria.

Después de seleccionar por localización en el citómetro, estos se marcan con CD3 y CD4. Los CD3+CD4+ son considerados linfocitos T helper, los CD3+CD4- son considerados como CD3+CD8+ y por tanto linfocitos T citotóxicos. Posteriormente en cada grupo se analiza la expresión de CD45RA y CD45RO.

### 7.3.2 Análisis de la expresión de IL-15 en la superficie celular

Para el estudio citométrico de IL-15 se emplearon los siguientes anticuerpos:

Tabla 16. Anticuerpos utilizados para el estudio citométrico de IL-15

| Anticuerpo monoclonal | Ig                 | Clon     | Fluorocromo | Marca comercial               |
|-----------------------|--------------------|----------|-------------|-------------------------------|
| IL-15                 | IgG <sub>1</sub>   | G243-886 | Biotina     | BD Bioscience                 |
| Control isotipo IL-15 | IgG <sub>1,κ</sub> | MOPC-21  | Biotina     | BD Bioscience                 |
| CD14                  | IgG <sub>1</sub>   | MEM-15   | Fitc        | ImmunoTools                   |
| Streptavidina         |                    |          | PE          | BD Bioscience/<br>ImmunoTools |

Para el proceso se utilizaron 3 tubos de citometría con 100 µl de sangre total cada uno.

- a. A cada tubo se le añadieron 3 ml de PBS.
- b. Se centrifugaron los tubos a 1750 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- c. Se aspiró el sobrenadante (para retirar la IL-15 contenida en suero)
- d. A partir de aquí a cada tubo se le añadió:
  - Tubo 1) 3 µl de IL-15 biotinilada diluida en PBS hasta un volumen final de 5 µl y 5 µl de CD14/Fitc.
  - Tubo 2) 10 µl de PBS.
  - Tubo 3) 5 µl de control isotipo de IL-15 y 5 µl de CD14/Fitc.
- e. Se incubaron los tres tubos 15 minutos a temperatura ambiente y a oscuras.
- f. Se añadieron 2 ml de PBS, volvimos a centrifugar y aspiramos de nuevo el sobrenadante.
- g. Añadimos 2 µl de Streptavidina/PE en cada tubo e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente y a oscuras.
- h. Añadimos de nuevo 2 ml de PBS, centrifugamos y aspiramos el sobrenadante.

i. Finalmente añadimos sucesivamente los tampones A, B y C utilizados ya en el resto de tubos de citometría.

Los niveles de IL-15 se determinaron en células CD14+ y se expresaron como la media de intensidad de fluorescencia (MIF). Se utilizó el correspondiente isotipo control para la tinción inespecífica.

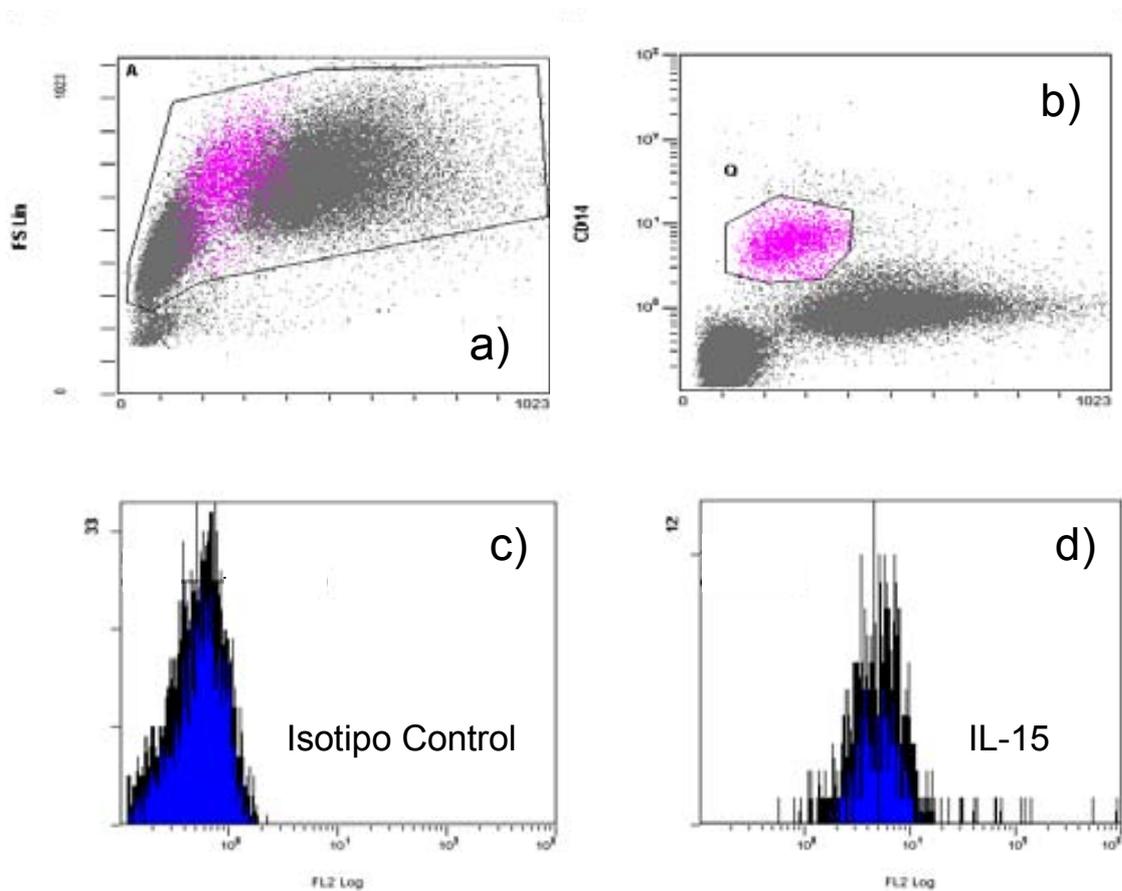


Figura 9. **Ejemplo de determinación de IL-15 en la superficie de los monocitos.**

a) y b) Imágenes que representan la selección de a) las células vivas y b) los monocitos mediante la expresión de CD14. c) y d) presentan la imagen en sangre de un paciente representativo marcado con isotipo control o con IL-15.

## 7.4. ELISA

ELISA "sándwich". En este tipo de ELISA se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Posteriormente se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno. Este antígeno quedará retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después se aplica un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, las moléculas de antígeno quedaran unidas a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

Los niveles de citoquinas presentes en los sobrenedantes de los cultivos fueron determinados mediante ELISA cuantitativo en sándwich en placas de 96 pocillos (Nunc) siguiendo el protocolo de cada kit.

### 7.4.1 ELISA de IL-15 (BD Bioscience Cat. 555212)

a. Inicialmente añadimos 50  $\mu$ l del anticuerpo de captura (G243-935) a cada pocillo de la placa a una concentración de 1  $\mu$ g/ml (diluido en solución de Binding). A continuación se incubó a 4 grados centígrados ( $^{\circ}$ C) durante toda la noche tapando la placa para evitar la evaporación.

b. Después de atemperar la placa, se descartó el anticuerpo de captura y se lavó la placa 3 veces con solución de lavado. Se bloqueó la placa añadiendo 200  $\mu$ l/pocillo de solución de bloqueo y se incubó durante una hora y media a temperatura ambiente. Después se descartó y lavó de nuevo con solución de lavado.

c. Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de los estándares (a las concentraciones de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,125, y 7,56 pg/ml) y de las muestras diluidas con solución de dilución (1/10). A continuación se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. Se aspiró y se lavó 3 veces.

d. Se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo de detección anti-IL-15 (G243-886) a cada pocillo a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Se aspiró y lavó la placa 5 veces con solución de lavado.

e. Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la streptavidina conjugada con HRP diluida en solución de dilución a 1/2000. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente se aspiró y se lavó 5 veces con solución de lavado.

f. Reacción de color con 3,3',5,5' Tetrametil benzidina (TMB): Se atemperó la solución de trabajo. Para preparar la solución de trabajo se mezclaron iguales volúmenes del reactivo sustrato A (Biolegend 421101) y del reactivo sustrato B (Biolegend 421101). Después se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo. Finalmente se paró la reacción colorimétrica añadiendo 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico al 25%.

g. La densidad óptica se obtuvo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y 620 nm de referencia.

-Para poder analizar la concentración de citoquinas de cada muestra se construyó una curva patrón con las absorbancias correspondientes a cada punto de los estándares. A partir de los valores de absorbancia obtenidos, la curva permitió extrapolar la concentración de la misma.

Solución de Binding: 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ajustado a pH 9.

Solución de lavado: PBS con 0,05% de Tween-20.

Solución de bloqueo: PBS con 1% de albúmina bovina.

Solución de dilución PBS con 0.05% de Tween -20 y 0.1% de albúmina bovina.

#### 7.4.2 ELISA de IL-17 (PreproTech Cat. 900-M84)

a. Inicialmente añadimos el anticuerpo de captura. Se diluyó el anticuerpo de captura con PBS hasta una concentración de 0,5 µg/ml y se añadieron 100 µl a cada pocillo de la placa. Posteriormente se incubó temperatura ambiente toda la noche tapando la placa para evitar la evaporación.

b. A continuación se descartó el anticuerpo de captura y se lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se bloqueó la placa añadiendo 300 µl/pocillo de solución de bloqueo y se incubó durante una hora como mínimo a temperatura ambiente. Después se descartó y lavó con PBS.

c. Posteriormente se diluyeron los estándares a las concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 pg/ml y las muestras con solución de dilución (1/3). Posteriormente se añadieron 100 µl de estándar o de muestra diluida en cada pocillo por triplicado. Se incubó a temperatura ambiente dos horas.

d. Se aspiró y lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se diluyeron el anticuerpo de detección hasta una concentración de 0,25 µg/ml. Se añadió 100 µl a cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente dos horas.

e. Se aspiró y lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se diluyeron 5,5 µl de streptavidina conjugada (BD554066) 1:2000 en solución dilución para un volumen total de 11 ml. Se añadieron 100 µl a cada pozo. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó la placa 4 veces.

f. Después se añadió 100 µl de solución de sustrato (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)) a cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

g. Finalmente se realizó la lectura de la densidad óptica. La densidad óptica se obtuvo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm y 650 nm de referencia.

Solución de lavado: PBS con 0,05% de Tween-20.

Solución de bloqueo: PBS con 1% de albúmina bovina.

Solución de dilución: PBS con 0.05% de Tween -20 y 0.1% de albúmina bovina.

## 7.5 Niveles de rituximab y anti-rituximab

Los niveles de RTX se midieron basalmente y a los 30, 90 y 180 días tras la primera infusión de cada ciclo.

### 7.5.1 Niveles de rituximab (determinados con el kit: PG-M-127-01-PROMONITOR®-RTX)

Reactivos suministrados en el kit:

Tabla 17. **Anticuerpos utilizados para el estudio de los niveles de rituximab**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Reactante A          | Anticuerpo de captura  |
| Reactante C          | Anticuerpo específico anti-estándar  |
| Reactante D          | Anticuerpo específico anti-rituximab   |
| Control +            | Control positivo. Utilizado para la realización de la curva de calibración de anti-Rituximab   |
| Estándar             | Utilizado para la realización de la curva de calibración de rituximab como proteína de captura |
| Reactante E          | Streptovidina-peroxidasa   |
| Tampón PTK           | Tampón de dilución   |
| Tampón de captura    |  |
| Tampón de lavado     |  |
| Solución de sustrato | Cromógeno estabilizado (Tetrametilbenzidina)   |
| Solución de parada   | Dilución de ácido clorhídrico  |

a. Se diluyó el reactante A en tampón de captura (1:500) y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se descartó el anticuerpo y se lavó 5 veces.

b. Se diluyó el estándar desde 1000 ng/ml hasta 0 ng/ml, bajando cada vez una proporción 2:3. Las muestras se diluyeron de 1/10 a 1/10240 con el tampón de dilución. Se añadieron 50 µl de de estándar y las 6 diluciones seriadas de cada muestra a los pocillos apropiados. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 300 rpm. Se descartó y lavó 5 veces.

c. Detección: Se añadieron 50 µl del reactante C (diluido 1/500 en tampón de dilución) en cada pocillo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 300 rpm. Se descartó y se lavó 5 veces.

d. Se añadieron 50 µl de reactante E (streptavidina-peroxidasa) en cada pocillo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 300 rpm. Se descartó el anticuerpo y se lavó 5 veces.

e. Se añadieron 50 µl de la solución sustrato a cada pocillo. Se dejó la reacción durante 20 minutos a oscuras.

f. Se añadieron 50 µl de solución de parada.

g. Se realizó la lectura de la densidad óptica: La densidad óptica se obtuvo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

### 7.5.2 Niveles de anticuerpos anti-Rituximab

(determinados con el kit: PG-M-127-02-PROMONITOR®-RTX)

Reactivos suministrados en el kit:

Tabla 18. **Reactivos suministrados en el kit para determinar los niveles de anticuerpos antirituximab**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Reactante A          | Anticuerpo de captura  |
| Reactante C          | Anticuerpo específico anti-estándar  |
| Reactante D          | Anticuerpo específico anti-anticuerpos anti-rituximab  |
| Control +            | Control positivo. Utilizado para la realización de la curva de calibración de anti-rituximab   |
| Estándar             | Utilizado para la realización de la curva de calibración de rituximab como proteína de captura |
| Reactante E          | Streptavidina-peroxidasa   |
| Tampón PTK           | Tampón de dilución   |
| Tampón de captura    |  |
| Tampón de lavado     |  |
| Solución de sustrato | Cromógeno estabilizado (Tetrametilbenzidina)   |
| Solución de parada   | Dilución de ácido clorhídrico  |

a. Se añadieron 50 µl de estándar en coating buffer en cada pocillo. Se incubaron dos horas a temperatura ambiente. Se descartaron y se lavaron 5 veces.

b. Se diluyó el control positivo desde 1810 a 0 AU/ml bajando la concentración 1:2 consecutivamente.

c. Posteriormente se añadieron 50 µl de cada punto de la dilución de control positivo con las seis diluciones de cada muestra en los pocillos apropiados. Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 300 rpm. Se descartaron y se lavaron 5 veces.

d. Se añadieron 50  $\mu$ l del reactante D en el tampón de dilución a cada pocillo. Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 300 rpm. Se descartó el anticuerpo y se lavó 5 veces.

e. Se añadieron 50  $\mu$ l de solución de sustrato a cada pocillo. Se dejó reaccionar durante 15 minutos en la oscuridad.

f. Se añadieron 50  $\mu$ l de solución de parada.

g. Lectura de la densidad óptica: la densidad óptica se obtuvo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

## 7.6 Análisis estadístico

Las variables fueron descritas a través de los parámetros media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para la comparación de valores entre dos grupos se utilizaron la prueba de la T de *student* en el caso de que los datos se ajustaran a una distribución normal y el test de Mann-Whitney en los casos en que no se pudo asumir normalidad o los valores no fueron paramétricos. Se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) si se debían comparar tres o más grupos.

Para medir las correlaciones se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, o de Spearman cuando se trató de variables no paramétricas.

Se consideró un nivel de significancia estadística si  $p < 0,05$ .

Para el análisis estadístico se utilizó la versión 18 del software (versión 18.0;SPSS Inc., Chicago, IL. EEUU) y el programa GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, EEUU)



## 8. Resultados

### 8.1 Datos basales de los pacientes

Durante el periodo del estudio, 39 pacientes con AR iniciaron tratamiento con RTX. De ellos, 6 (15,45%) se excluyeron del estudio. Los motivos por los que se considero que estos seis pacientes con AR no debían incluirse fueron los siguientes:

-Dos enfermos tenían contraindicado el uso de corticoides (en un caso por el antecedente de posible alergia y en el otro por el antecedente de brote psicótico secundario a la toma de prednisona) por lo que no se les administró los 100 mg de metilprednisolona en la pauta de premedicación como al resto de pacientes.

-Otros dos casos fueron enfermos en los que rituximab fue la primera terapia biológica utilizada ya que la terapia con anti-TNF estaba contraindicada. En el resto de pacientes rituximab se administró como terapia de segunda línea o posterior.

-Un enfermo cambió de centro por cambio de domicilio y dejó de acudir a nuestras consultas.

-Un enfermo no toleró la primera infusión con rituximab y abandonó el tratamiento y por tanto el estudio.

Las características basales sociodemográficas, clínicas y de tratamiento de los 33 enfermos con AR que participaron en el estudio se muestran en las tablas a continuación:

Tabla 19. **Características basales sociodemográficas de los enfermos que participaron en el estudio**

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Edad; años; media (rango) | 62,4 (37-81) |
| Sexo; % mujeres           | 93,1         |



## 8.2 Resultados clínicos

La eficacia clínica de rituximab se valoró en los tres ciclos de tratamiento utilizando los índices compuestos DAS28, SDAI y CDAI, así como PCR, VSG, HAQ y tras clasificar a los pacientes según los criterios de respuesta EULAR.

Rituximab demostró ser un fármaco eficaz a los 3 y 6 meses y durante los 3 ciclos de tratamiento.

Los resultados clínicos se muestran a continuación.

### 8.2.1 Respuesta clínica según índices compuestos

Rituximab ha demostrado ser un fármaco eficaz. Tanto en el total, como en cada uno de los ciclos de infusión del fármaco por separado, se demostró una disminución de la actividad clínica de la enfermedad medida por DAS28 que fue estadísticamente significativa (nos referiremos al DAS28-VSG, ya que es el que utilizamos normalmente) (fig. 10).

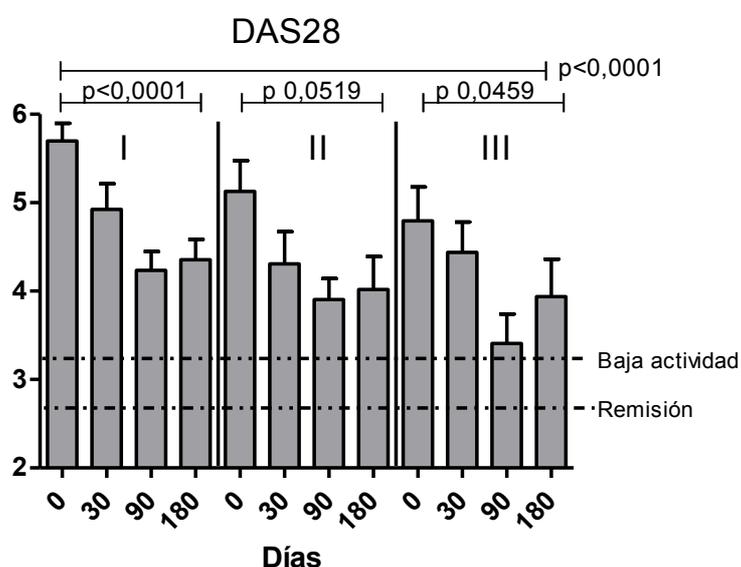


Figura 10. **Evolución clínica de los enfermos durante los 3 ciclos medida por DAS28.** Se indican los valores de DAS28 en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Se considera un DAS28 de baja actividad por debajo de 3,2 y un DAS28 de remisión por debajo de 2,6. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

La mejoría clínica fue estadísticamente significativa a lo largo de todo el tratamiento y en el primer y en el tercer ciclo. En el segundo ciclo se encontró una tendencia a la mejoría aunque no fue estadísticamente significativa.

Durante los tres ciclos se observó mejoría ya a los 30 días tras el tratamiento con RTX. Como se observa también en la tabla 22, la mejor respuesta clínica se consiguió siempre a los 90 días, volviendo a empeorar ligeramente a los 180 días.

**Tabla 22. Cambios del DAS28 respecto al inicio del tratamiento y respecto a la infusión inicial de cada ciclo**

|              | Cambio respecto DAS28 basal inicial | Cambio respecto DAS28 basal de ciclo | P      |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------|
| I-90 días    | -1,74                               |                                      | <0,001 |
| I-180 días   | -1,63                               |                                      | <0,001 |
| II-90 días   | -2,08                               | -1,22                                | <0,001 |
| II-180 días  | -1,96                               | -1,1                                 | 0,001  |
| III-90 días  | -2,58                               | -1,39                                | <0,001 |
| III-180 días | -2,05                               | -0,86                                | 0,001  |

Los enfermos con RTX mejoraron clínicamente tras el primer ciclo, y esta mejora fue en aumento tras cada ciclo de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ )

Parte de estos resultados son similares a los que se objetivan en el estudio MIRAR (estudio observacional español en el que se siguieron 575 enfermos tratados con rituximab que habían fracasado previamente a terapia anti-TNF). En el que tras el primer ciclo de RTX se observó una disminución del DAS28 a los 6 meses de 1,61, prácticamente idéntica al 1,63 obtenido en nuestra cohorte [215].

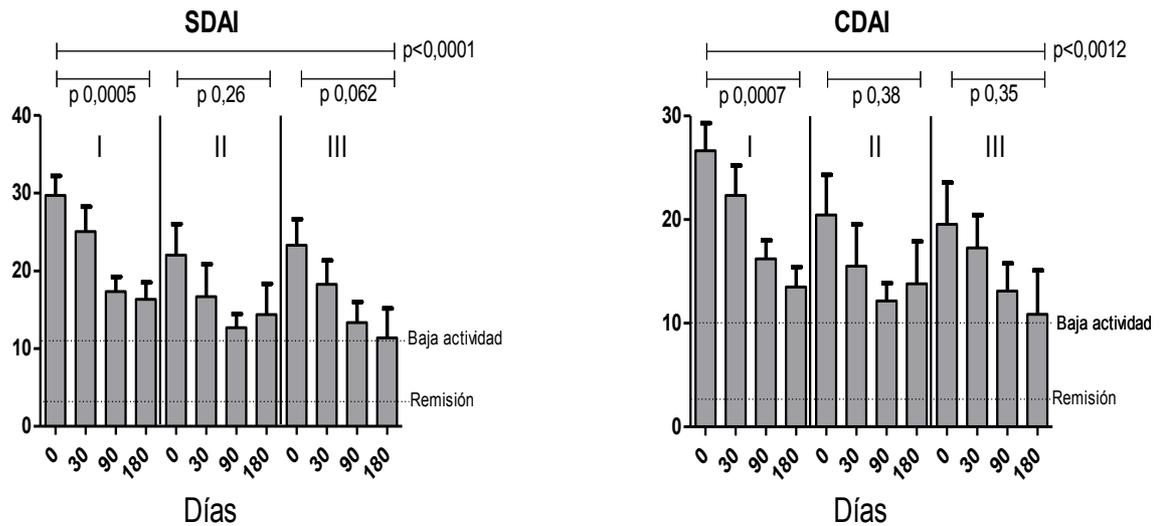


Figura 11. **Evolución clínica de los enfermos durante los 3 ciclos medida por SDAI y CDAI.** Se indican los valores de SDAI y CDAI en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan en media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Se considera un SDAI de baja actividad por debajo de 11 y un SDAI de remisión por debajo de 3,3. En el caso del CDAI, se considera baja actividad por debajo de 10 y remisión por debajo de 2,8. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias de todos los tiempos y dentro de cada ciclo.

Si utilizamos los índices compuestos SDAI y CDAI se observa también una mejoría estadísticamente significativa a través de todos los tiempos. Tanto en el SDAI como en el CDAI hay una mejoría clínica estadísticamente significativa tras el primer ciclo. En los ciclos posteriores la mejoría conseguida se mantiene pero no aumenta significativamente. A diferencia del DAS28, en que la máxima mejoría de cada ciclo se daba siempre a los 90 días, en CDAI y SDAI se alcanza a veces a los 90 días y otras a los 180 días.

## 8.2.2 Reactantes de fase aguda: VSG y PCR

Los reactantes de fase aguda forman parte del conjunto mínimo de parámetros para evaluación de la AR recomendados por OMERACT 1993 (Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials). Se deberán utilizar tanto en la evaluación inicial como en el seguimiento. El comportamiento de estos dos reactantes de fase aguda tiene una estrecha relación con la actividad y pronóstico de la enfermedad.

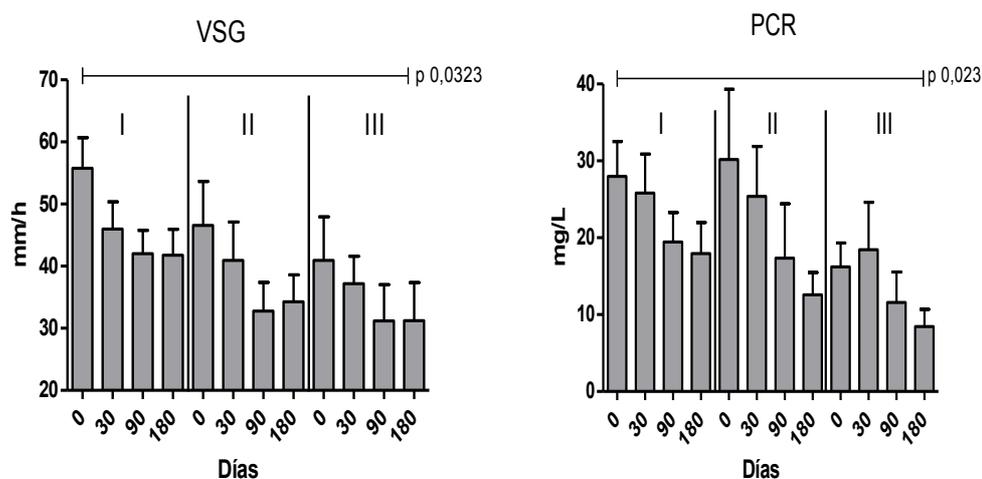


Figura 12. **Evolución de la VSG y la PCR durante los tres ciclos tras el tratamiento con rituximab.** Se indican los valores de la VSG (mm/h) y PCR (mg/L) en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Se muestra la VSG y la PCR a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

La VSG disminuyó de forma estadísticamente significativa ( $p 0,0323$ ), respecto al tiempo basal y en cada ciclo. Después del primer ciclo se observó una tendencia a continuar con la mejoría ( $p 0,057$ ).

Igualmente, la PCR disminuyó de forma significativa tras el primer ciclo y en los posteriores. La mejoría respecto al tiempo basal se mantuvo, pero no aumentó. En el primer y segundo ciclo la mejoría fue estadísticamente significativa, pero en el tercer ciclo solo se observó una tendencia ( $p 0,0673$ ).

### 8.2.3 HAQ

La puntuación del HAQ expresa la limitación de los enfermos en la capacidad funcional. La puntuación máxima, que indica máxima incapacidad, es 3, y la mínima 0.

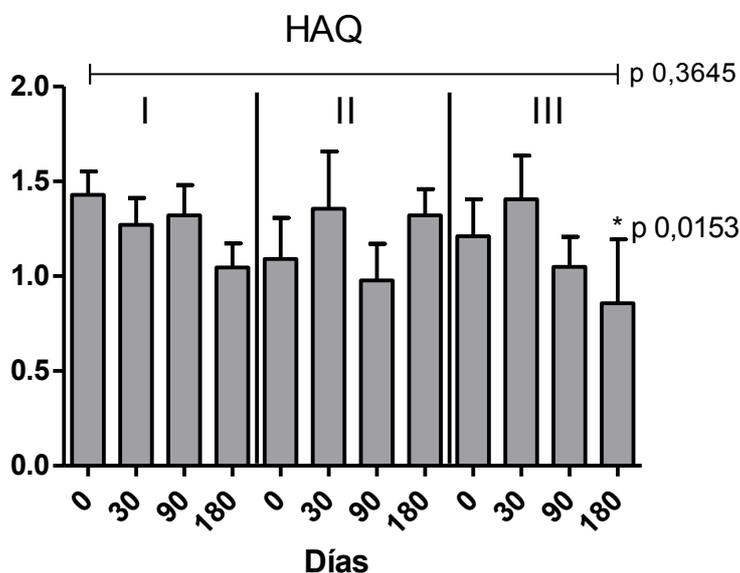


Figura 13. **Evolución del HAQ tras el tratamiento con rituximab.** Se indican los valores del HAQ en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos. Se realizó una T de *Student* para comparar las medias de dos tiempos entre ellas.

En los enfermos de nuestro estudio se observa una tendencia a disminuir progresivamente aunque no fue estadísticamente significativa, ni respecto al tiempo basal (p 0,3645) ni en ninguno de los tres ciclos. Pero al comparar la media de los resultados basales con los obtenidos a los 180 días de cada ciclo encontramos una mejoría estadísticamente significativa (p 0,0468) o si comparamos la media de los resultados del HAQ basal con la de 6 meses tras la última infusión la mejoría también es estadísticamente significativa (p 0,0153)

A lo largo del estudio 5 (15,2%) pacientes consiguieron en algún momento una puntuación de 0.

## 8.2.4 Respuesta clínica según la clasificación EULAR

Los criterios de respuesta EULAR consideran la mejoría del paciente y su situación tras el tratamiento. Los criterios de respuesta ACR, en cambio, no tienen en cuenta la situación del paciente tras el tratamiento. Por este motivo, tanto la SER, como otras sociedades, recomiendan el uso de los criterios EULAR, o de modificaciones de los criterios ACR que añadan la situación clínica final del enfermo.

Tabla 23. **Porcentaje de pacientes que consiguen respuesta EULAR**

| Criterios EULAR    | Ciclo I |      | Ciclo II |      | Ciclo III |     |
|--------------------|---------|------|----------|------|-----------|-----|
|                    | 90      | 180  | 90       | 180  | 90        | 180 |
| Respondedor (%)    | 75      | 65,5 | 62,5     | 76,9 | 80        | 75  |
| No respondedor (%) | 25      | 34,5 | 37,5     | 23,1 | 20        | 25  |

El porcentaje de enfermos que consiguen una respuesta EULAR moderada o buena varía entre un 62,5 y un 80% de los pacientes dependiendo del ciclo y del momento en que se realiza el análisis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres ciclos.

## 8.3 Resultados analíticos

### 8.3.1 Hemograma

La depleción directa de los linfocitos B podría hacernos pensar que encontraríamos cambios en el recuento leucocitario. Sin embargo, como se observa en la figura 14, a lo largo del tratamiento con rituximab, no se encontraron cambios en el número absoluto de leucocitos, neutrófilos ni linfocitos a lo largo de los tres ciclos.

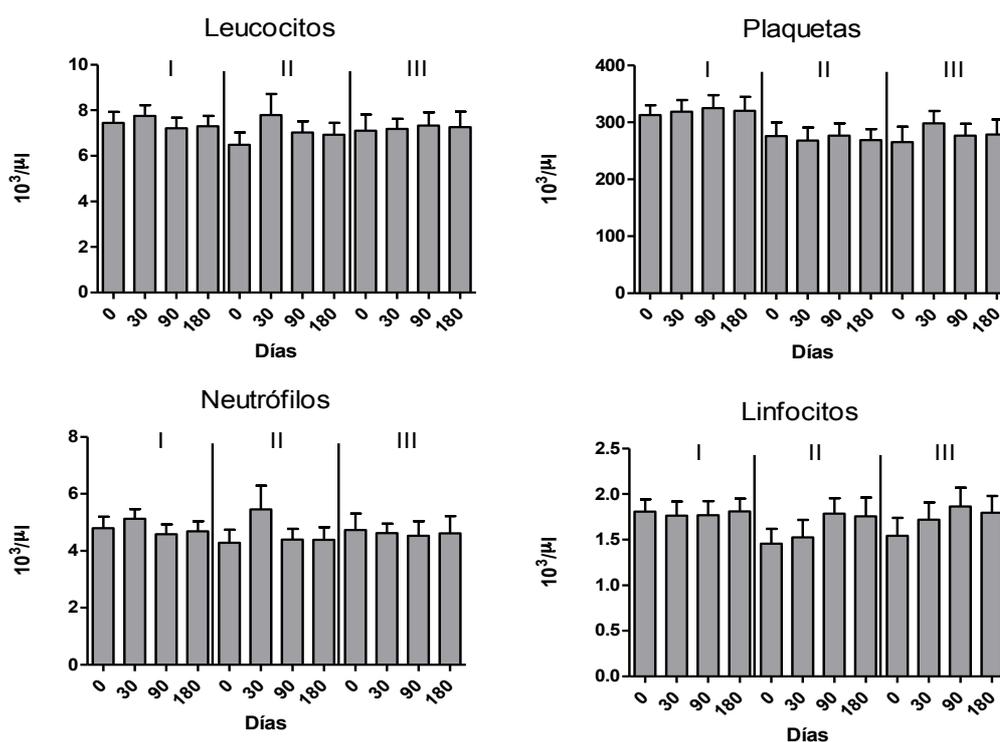


Figura 14. **Evolución de los leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas tras el tratamiento con rituximab.** Se muestra la concentración de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ ) a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de los leucocitos en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

Se considera que el número de plaquetas en sangre se comporta como un reactante de fase aguda, aumentando cuando aumenta la inflamación e igual a la inversa. Sin embargo, a pesar de la mejoría clínica, en nuestros pacientes no se observó un cambio estadísticamente significativo en el nivel de plaquetas a lo largo del tratamiento con rituximab.

### 8.3.2 Inmunoglobulinas

Es esperable que la concentración de inmunoglobulinas tras un primer ciclo de rituximab se mantenga dentro del rango de la normalidad, pero el tratamiento con cursos repetidos podría asociarse a un aumento del riesgo de hipogammaglobulinemia. En estudios previos se observó que la IgM es la inmunoglobulina con una mayor tendencia a llegar a niveles por debajo de la normalidad y la IgA la que menos [197,199,216].

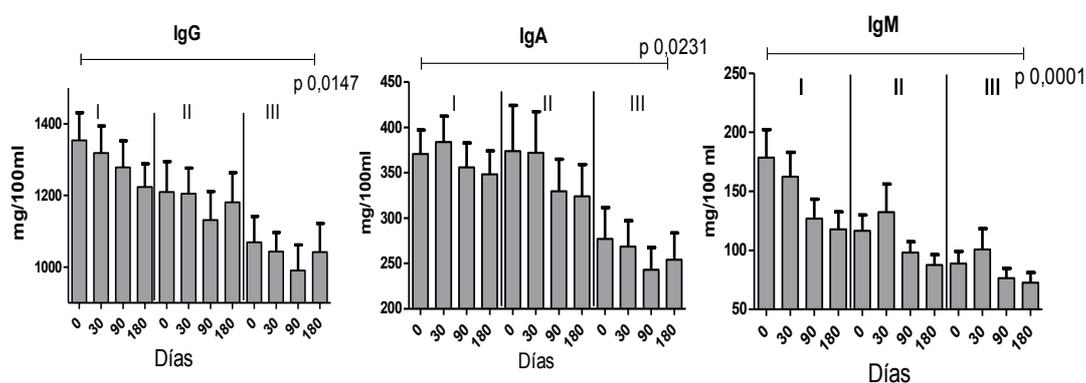


Figura 15. **Evolución de los niveles de IgG, IgA e IgM tras el tratamiento con rituximab.** Se muestra la concentración de las distintas inmunoglobulinas (mg/100ml) a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de los leucocitos en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan en media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

En nuestro trabajo, los niveles de IgG bajaron progresivamente de manera estadísticamente significativa ( $p 0,0147$ ) a lo largo de todo el tratamiento con rituximab. El nivel de IgG más elevado fue al inicio del tratamiento con 1354 mg/100ml y el más bajo a los 3 meses tras el tercer ciclo, en que la bajada fue del 26,9%. Sin embargo, tras tres ciclos de rituximab ningún enfermo alcanzó niveles inferiores a 500 mg/100ml. Los niveles de IgA también bajaron de manera estadísticamente significativa ( $p 0,0231$ ) a lo largo del tratamiento con rituximab. Durante los dos primeros ciclos, los niveles se mantuvieron estables, para disminuir de una manera más importante tras el tercer ciclo. El nivel más bajo de IgA volvió a darse a los tres meses tras el tercer ciclo de tratamiento, en que la disminución fue de un 34,45%.

Los niveles de IgM bajaron también de forma progresiva a lo largo de los tres ciclos de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). El nivel más bajo de IgM se dio 6 meses después del tercer ciclo de tratamiento. La disminución fue de un 59% respecto al nivel previo al tratamiento deplector de linfocitos B.

### 8.3.3 Autoanticuerpos: FR y a-CCP

En múltiples estudios previos se ha demostrado que rituximab disminuye los niveles del factor reumatoide y de los a-CCP [217].

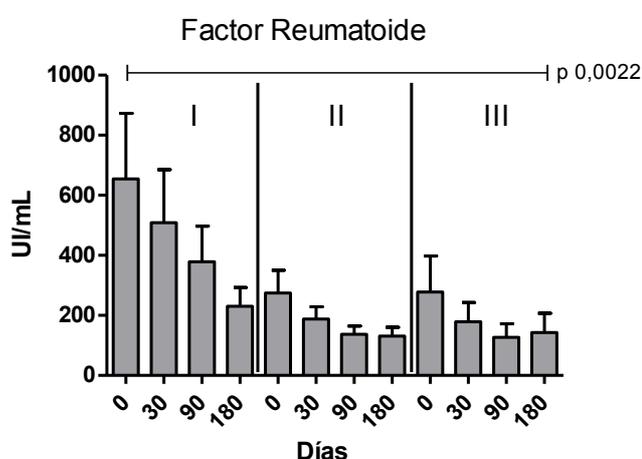


Figura 16. **Evolución de los niveles del factor reumatoide tras el tratamiento con rituximab.** Se muestra la concentración del FR (UI/ml) a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de los leucocitos en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan en media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

En nuestros pacientes se observó un descenso rápido y estadísticamente significativo de los niveles de factor reumatoide ( $p < 0,0022$ ) a lo largo del tratamiento con rituximab. La media del nivel del FR en suero disminuyó más del 80% ya a partir del segundo ciclo, manteniéndose posteriormente. Un 16% de los enfermos negativizaron sus valores a lo largo del tratamiento. Los enfermos que negativizaron sus valores eran aquellos con valores positivos basales más bajos.

En el caso de los a-CCP no se pudo cuantificar exactamente su evolución ya que nuestro laboratorio central de manera rutinaria no calcula la concentración más allá de 340 UI/ml. De todas formas, se observó que un 26,7% de los enfermos con niveles de a-CCP por encima de este rango disminuían a niveles inferiores a 340 UI/ml. En el caso de los enfermos que partían con niveles inferiores a 340 UI/ml y que podíamos cuantificar, encontramos una disminución en 10 (83,3%) de ellos, mientras que en los dos (16,7%) restantes estos niveles se mantenían.

### 8.3.4 Análisis de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica

#### Linfocitos B

En todos los estudios publicados hasta el momento, el tratamiento con RTX ha sido efectivo en la depleción de células B. Las diferencias entre los valores de la depleción y las conclusiones de cada estudio han venido determinadas por como se define depleción y por el uso, o no, de análisis de citometría de alta sensibilidad, en el que se miden como mínimo 500.000 eventos [218].

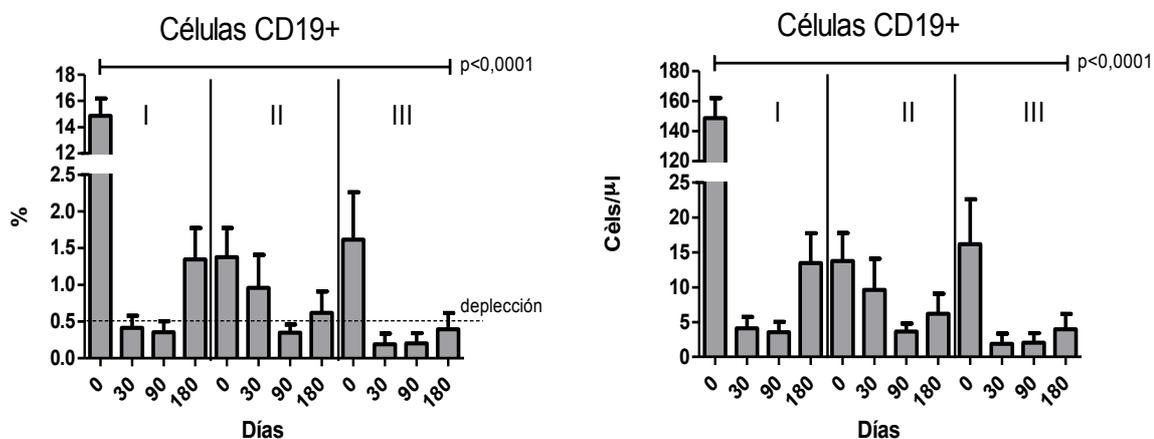


Figura 17. Evolución del porcentaje y número total de células B (CD19+) tras el tratamiento con rituximab. Se determinaron el porcentaje de células CD19+ sobre la población de linfocitos por citometría de flujo. Para determinar el número total de células B se utilizó el porcentaje de células CD19+ sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de las células B en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Se consideró depleción de células B a un porcentaje inferior al 0,5%. Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

En nuestros enfermos, rituximab se confirmó como un fármaco eficaz en la depleción de linfocitos B ( $p < 0,0001$ ). Además esta depleción mejoró tras cada ciclo, especialmente en el tercero. En todos los ciclos el momento en que los linfocitos B tuvieron niveles más bajos fue a los 90 días, para recuperarse parcialmente a los 180 días, sin llegar nunca a los niveles basales. Esta eficacia se confirmó al analizar los números absolutos de células CD19+.

Analizados, como mínimo, 20.000 eventos no encontramos asociación entre los niveles previos de linfocitos B y la consecución de la depleción o la duración de la misma. Tampoco encontramos asociación entre la depleción conseguida y la respuesta clínica valorada según los criterios EULAR. Estos resultados son similares a los observados mayoritariamente en los estudios previos, excepto un único estudio muy reciente, en que empleando citometría de análisis de alta sensibilidad encontró una clara correlación entre la depleción de células B y la respuesta clínica medida por EULAR [219].

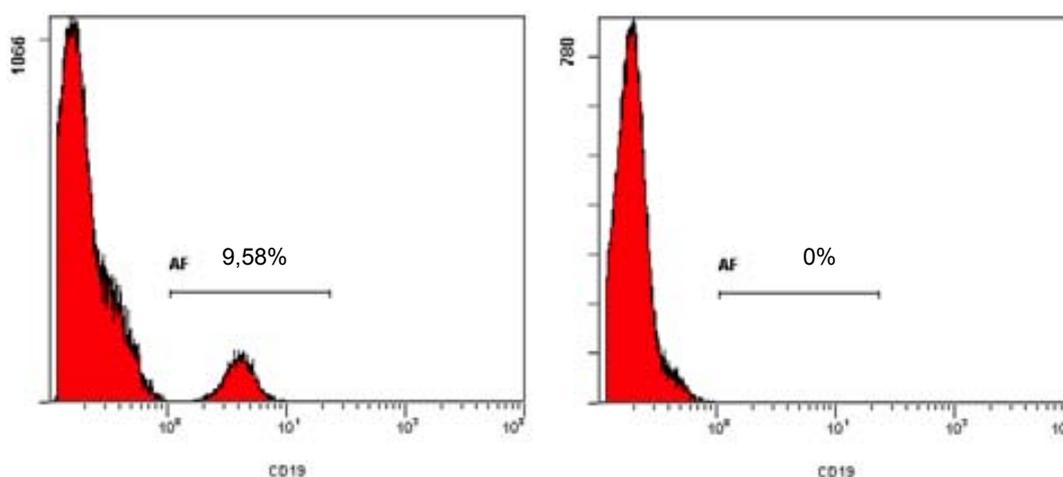


Figura 18. **Depleción de las células CD19+.** Treinta días después de la primera infusión se observa la total depleción de células CD19+ en un enfermo representativo.

Tabla 24. **Porcentaje de enfermos en los que se consigue la depleción de los linfocitos B (Células CD19+ < 0,5%)**

| Ciclo I |         |          | Ciclo II |         |          | Ciclo III |         |          |
|---------|---------|----------|----------|---------|----------|-----------|---------|----------|
| 30 días | 90 días | 180 días | 30 días  | 90 días | 180 días | 30 días   | 90 días | 180 días |
| 82%     | 80,7%   | 58,1%    | 72,2%    | 80,7%   | 75%      | 94,1%     | 93,8%   | 84,6%    |

Cuando se valoró el porcentaje de enfermos en los que se alcanzó la depleción se observó una tendencia a aumentar tras cada ciclo sin alcanzarse la significancia estadística ( $p 0,0628$ ).

## Linfocitos T y células NK

Prácticamente no existen datos publicados respecto a los cambios que aparecen en las distintas poblaciones linfocitarias tras el tratamiento con rituximab en enfermos con AR. Existe un único estudio previo en el que se trataron 18 pacientes con un seguimiento de solo un mes [220]. No hay estudios con resultados más allá de este mes o con más ciclos de tratamiento.

En nuestros pacientes el tratamiento con rituximab no provocó cambios específicos en el número total de células T, células T helper o células T citotóxicas a los 30, 90 o 180 días. Las células NK aumentaron de manera estadísticamente significativa durante el primer ciclo y se mantuvieron estables en los dos siguientes. Los números totales de células T y células NK se mantuvieron en los niveles de normalidad durante todo el periodo del estudio.

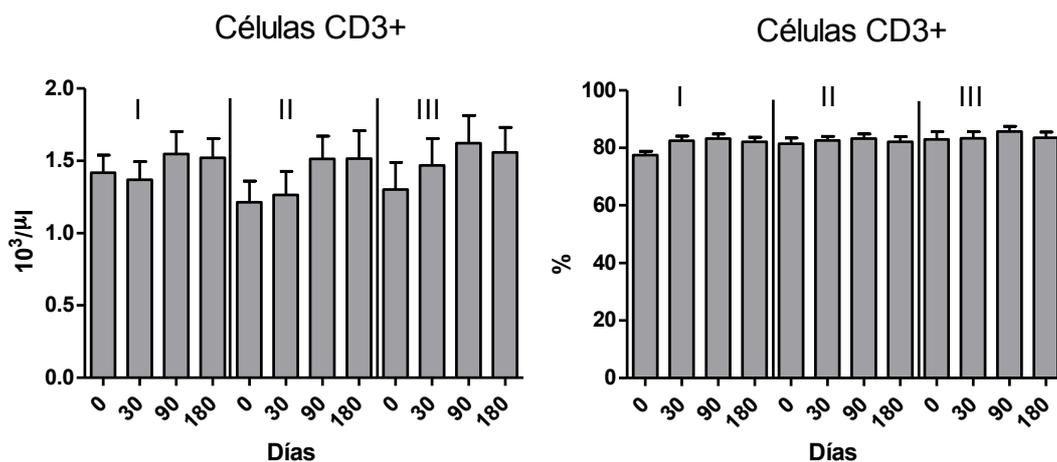


Figura 19. **Evolución de los linfocitos T (CD3+) tras el tratamiento con rituximab.**

Se determinaron el porcentaje de células CD3+ sobre la población de linfocitos por citometría de flujo. Para determinar el número total de células CD3+ se utilizó su porcentaje sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de las células CD3+ en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

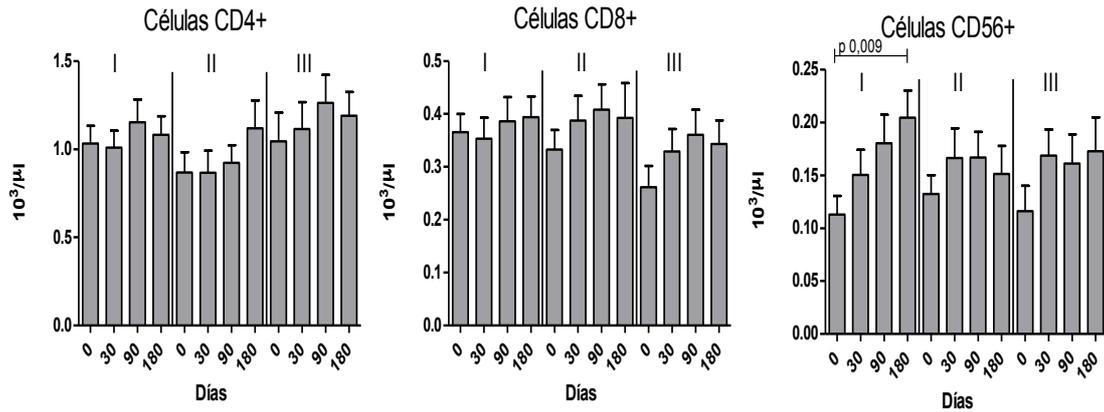


Figura 20. **Evolución de los linfocitos T helper (CD4+), T citotóxicos (CD8+) y células NK (CD56+) tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar el número total de células T helper, T citotóxicos y células NK se utilizó el porcentaje de células CD4+, CD8+ y CD56+ sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de células T helper, citotóxicos y NK en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan en media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

El número absoluto de células CD4+ y CD8+ se mantuvo estable a lo largo del tratamiento con rituximab. Ni en el total ni en ninguno de los 3 ciclos se encontraron cambios estadísticamente significativos. Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de células CD4+ ni CD8+.

Al estudiar el número absoluto y porcentaje de células CD56+ en la totalidad del tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tras la primera infusión de rituximab se observó un aumento de las células CD56+ estadísticamente significativo ( $p 0,009$ ). En el segundo y tercer ciclo, en cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## Linfocitos T helper y citotóxicos de memoria y naïve

Además de medir la evolución de las células T, las células T helper y las células T citotóxicas, también hemos estudiado la evolución de las células naïve y de memoria.

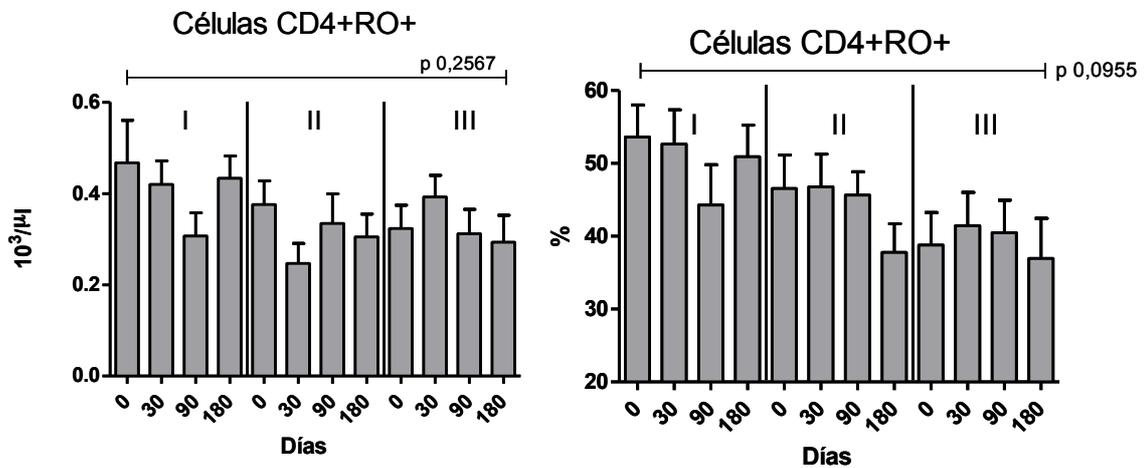
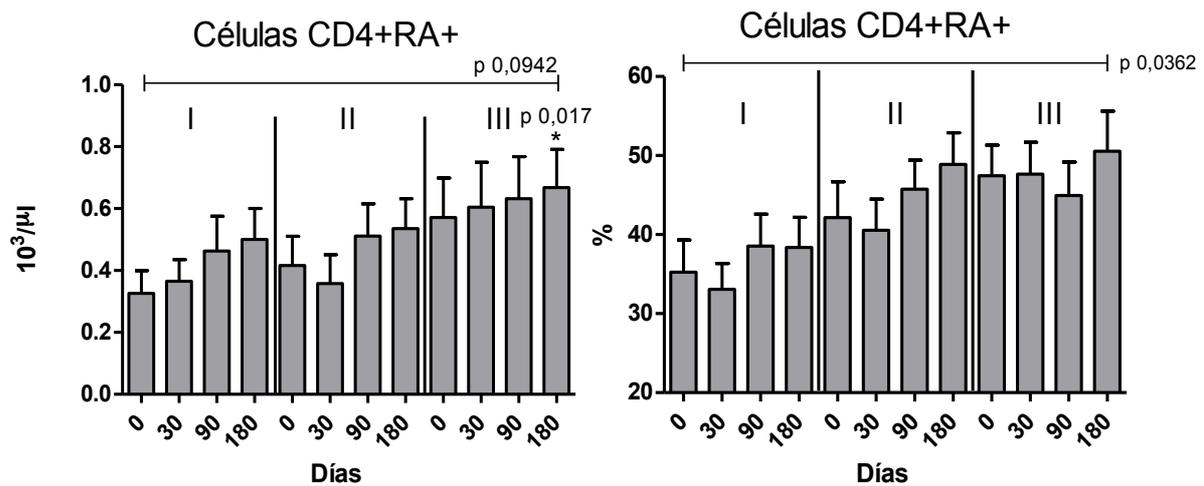


Figura 21. **Evolución del número absoluto y porcentaje de linfocitos T helper de memoria (CD4+RO+RA-) tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar el número total de linfocitos T helper de memoria se utilizó el porcentaje de células CD4+RO+RA- sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. El porcentaje de células CD4+RO+RA- se determinó sobre el total de células CD4+. Se indican los valores de linfocitos T helper de memoria en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan con la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos. Se realizó una T de *Student* para comparar las medias de dos tiempos entre ellas.

En nuestros enfermos con AR tratados con rituximab se observó una disminución de las células CD4 de memoria, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa ( $p 0,2567$ ).

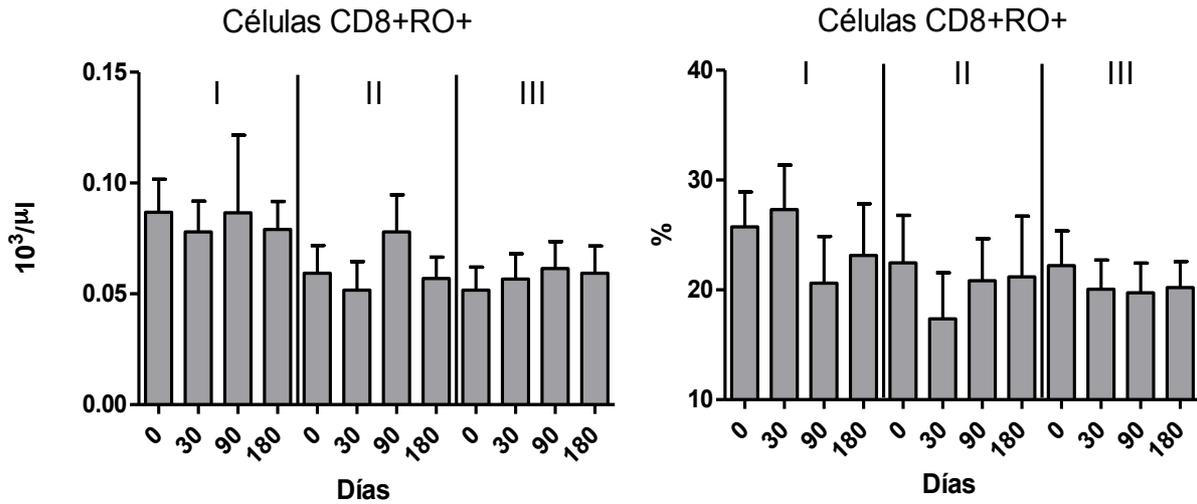
También se observó una disminución del porcentaje de células T CD4+ de memoria. Al analizar todos los tiempos del seguimiento esta disminución tampoco fue estadísticamente significativa ( $p 0,0955$ ). Pero si comparamos las células CD4+RO+RA- del tiempo basal con las del último control del seguimiento o con los 180 días de cada uno de los tres ciclos sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p 0,0237$  y  $p 0,0281$  respectivamente).



**Figura 22. Evolución del número total y del porcentaje de linfocitos T helper naïve tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar el número total de linfocitos T helper naïve se utilizó el porcentaje de células CD4+RO-RA+ sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. El porcentaje de células CD4+RO-RA+ se determinó sobre el total de células CD4+. Se indican los valores de linfocitos T helper naïve en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan con la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos. Se realizó una T de *Student* para comparar las medias de dos tiempos entre ellas.

El número total de células T CD4+ naïve fue aumentando tras cada infusión, pero no de manera estadísticamente significativa ( $p$  0,0942). Sin embargo, a los 6 meses del último ciclo de tratamiento el número de células T CD4+ naïve doblaba al número de células T helper naïve basales ( $p$  0,0171).

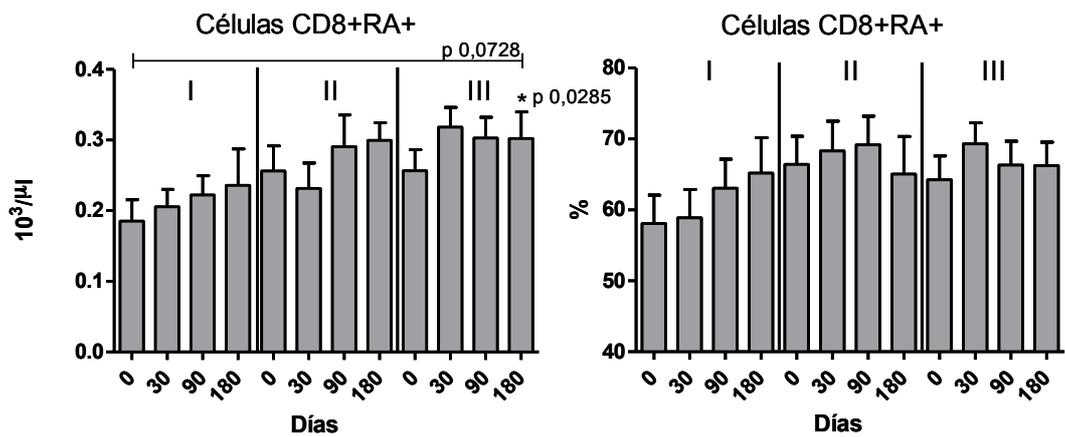
El porcentaje de células T helper naïve también subió de manera progresiva a lo largo de los tres ciclos de RTX, y además al comparar todos los tiempos, lo hizo de manera estadísticamente significativa ( $p$  0,0362)



**Figura 23. Evolución del número total y porcentaje de células T citotóxicas de memoria tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar el número total de linfocitos T citotóxicos de memoria se utilizó el porcentaje de células CD8+RO+RA- sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. El porcentaje de células CD8+RO+RA- se determinó sobre el total de células CD8+. Se indican los valores de linfocitos T citotóxicos de memoria en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan con la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

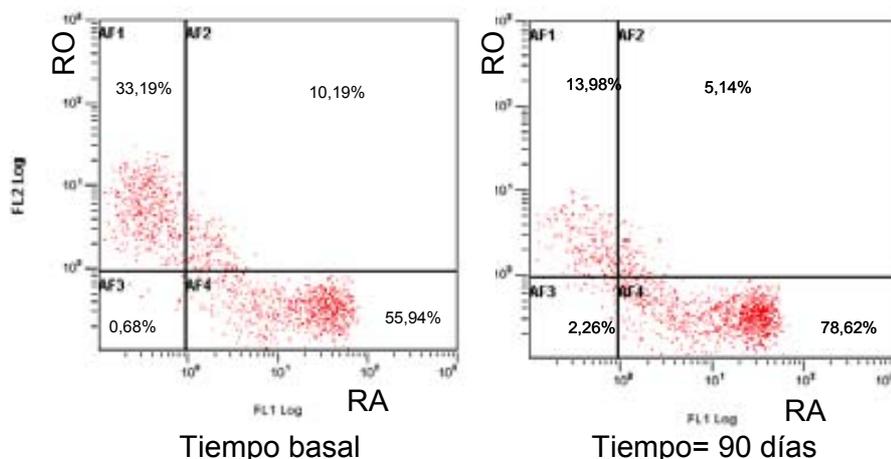
A lo largo de los tres ciclos de tratamiento con RTX se observó una disminución tanto del número total como del porcentaje de células CD8+ de memoria que no fue estadísticamente significativa.

Al comparar los niveles iniciales tanto del número total de células CD8+CD45RO+, como del porcentaje, con los hallados a los 6 meses del tercer ciclo, se observó que los niveles finales también eran inferiores, pero tampoco de manera estadísticamente significativa.



**Figura 24. Evolución del número total y porcentaje de células T citotóxicas naïve tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar el número total de linfocitos T naïve de memoria se utilizó el porcentaje de células CD8+RO+RA- sobre el total de linfocitos por citometría de flujo y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. El porcentaje de células CD8+RO+RA+ se determinó sobre el total de células CD8+. Se indican los valores de linfocitos T citotóxicos naïve en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan con la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 33 enfermos, el segundo 28 y el tercero 23. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos. Se realizó una T de *Student* para comparar las medias de dos tiempos entre ellas.

Tras el tratamiento con rituximab se observó un aumento de las células T CD8+ naïve que no fue estadísticamente significativa (p 0,0728). En cambio, si que se encontró una diferencia estadísticamente significativa (p 0,0285) entre los niveles basales y los de 6 meses tras el último ciclo de RTX. En cambio al analizar el porcentaje de células CD8+CD45RA+, se observa un aumento progresivo, tanto del número total de células como del porcentaje, pero que no es estadísticamente significativo.



**Figura 25. Evolución de la expresión de CD45RO y CD45RA en linfocitos CD8+. Se observa como en un paciente representativo a los 90 días disminuye el porcentaje de células RO+ y aumenta el porcentaje de células RA+ comparado con el tiempo basal.**

### 8.3.4 Correlación entre la ratio de células T citotóxicas de memoria/naïve y la actividad clínica medida por DAS28

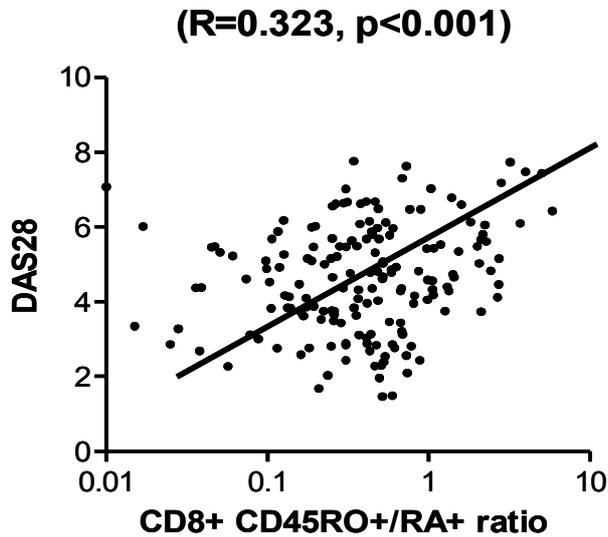


Figura 26. **Correlación entre la actividad de la clínica de la artritis reumatoide medida por DAS28 y la ratio de células CD8+CD45RO+/RA+.** Se utilizaron los datos de los 33 pacientes y de todos los tiempos y ciclos. Para medir la correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

En nuestros enfermos se observó que los cambios en la ratio entre las células CD8+CD45RO+/RA+ se correlacionaron con la actividad de la enfermedad medida por el DAS28 de manera estadísticamente significativa (R=0,323, p<0,001).

Se encontró también una correlación entre la ratio CD8CD45RO+/RA+ con la VSG (R=0,357; p<0,001) y la PCR (R=0,369; p<0,001).

### 8.3.5 IL-15

#### Niveles de IL15 en suero

Citoquinas como la IL-15 son esenciales para la supervivencia de las células T de memoria. La IL-15 es una citoquina pleiotrópica proinflamatoria que se expresa en distintas enfermedades inflamatorias. No todos los enfermos afectados de AR presentan IL-15 en suero, aunque todos la presentan transmembrana [221].

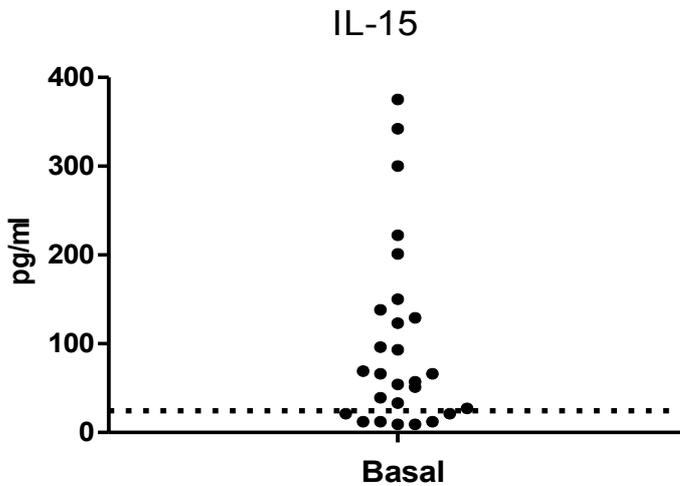


Figura 27. **Niveles de IL-15 (pg/ml) en suero de los 33 enfermos con artritis reumatoide tratados con rituximab que entraron en el estudio.** Se determinó el nivel de IL-15 mediante técnica de ELISA (BD Bioscience Cat. 555212). La línea discontinua representa la media de los donantes sanos (n=10).

Se detectaron niveles de IL-15 en sangre en 23 (67,7%) pacientes de los 33. En estos pacientes (serIL15+) la media fue de  $137 \pm$  pg/ml. La IL-15 fue indetectable (<40 pg/ml) en el resto de los pacientes (serIL15-) y en los donantes (n=10) durante todo el seguimiento.

Los niveles iniciales de IL-15 no se correlacionaron con la actividad clínica de la enfermedad (DAS28, VSG o PCR).

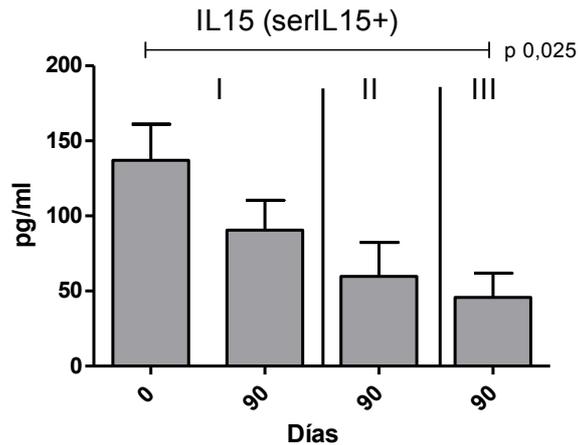


Figura 28. **Evolución de los niveles de IL-15 en suero de los 23 pacientes.** Se determinó el nivel de IL-15 (pg/ml) mediante técnica de ELISA (BD Bioscience Cat. 555212) en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Se escogió el tiempo de 90 días por ser cuando se observó un mayor descenso. Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 23 enfermos, el segundo 20 y el tercero 17. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

Tras el tratamiento con rituximab los niveles en suero de IL15 disminuyeron de manera estadísticamente significativa ( $p = 0,025$ ). A los 90 días tras la primera infusión ya se observó un descenso cercano a un tercio, y tras el tercer ciclo los niveles de IL-15 habían disminuido en más de un 50% ( $48 \pm 18$  pg/ml,  $p=0,03$ )

### Niveles de IL15 transmembrana

Estudios recientes indican que la forma bioactiva de IL-15 es un complejo funcional asociado a una cadena IL-15Ra. Células, como los monocitos, pueden coexpresar IL-15Ra para transpresentar la IL-15 a las células encargadas de la respuesta inmune. Todos nuestros pacientes presentaron IL-15 transmembrana en la superficie de los monocitos, aunque en niveles variables.

En el grupo de enfermos serIL15- la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para IL-15 era superior al grupo serIL15+ ( $4,82$  vs  $3,64$ ;  $p = 0,0489$ ). Por este motivo decidimos estudiar los comportamientos de los dos grupos de manera separada para analizar sus diferencias en la evolución inmunológica de la enfermedad tras el tratamiento con RTX.

En los donantes sanos la MIF de IL-15 en membrana fue de  $1,40 \pm 0,19$ . Este nivel fue significativamente inferior a los que encontramos en los enfermos serIL15+ o serIL15-.

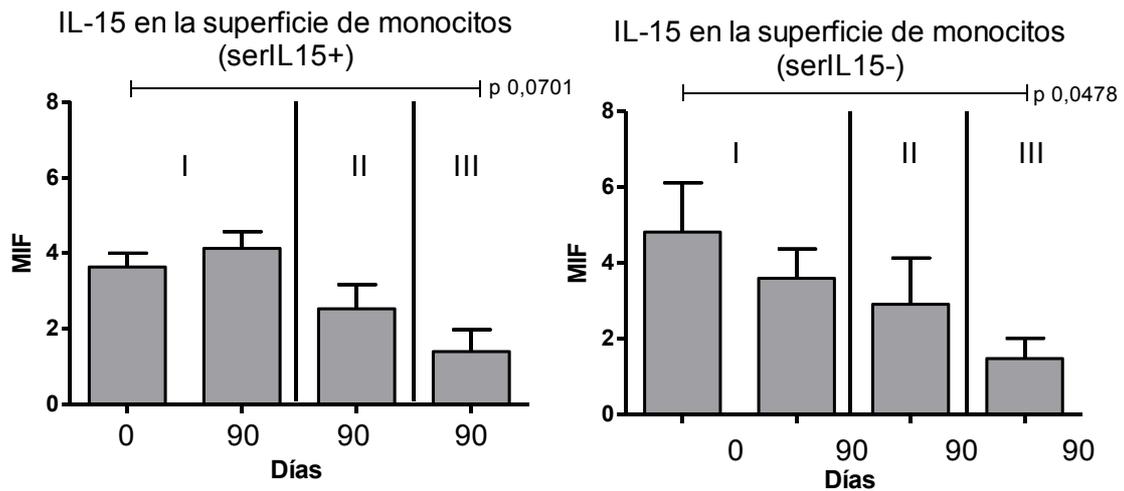


Figura 29. **Evolución de la MIF de IL-15 en la superficie de los monocitos de los pacientes con y sin IL-15 en suero tras el tratamiento con rituximab.** Los niveles de IL-15 se determinaron en monocitos (CD14+) por citometría y se expresan como media de intensidad de fluorescencia en los tres ciclos de infusión de rituximab (I,II,III). Se escogió el tiempo de 90 días por ser cuando se observó un mayor descenso. Los valores se expresan con la media más la barra de error correspondiente al SEM. Iniciaron el primer ciclo 23 enfermos, el segundo 20 y el tercero 17. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

Como se observa en la figura en ambos grupos se observó un descenso de la MIF de IL-15. En el grupo serIL15- este descenso fue estadísticamente significativo ( $p = 0,0476$ ), mientras que en el grupo serIL15+ solo observó una tendencia ( $p = 0,0701$ ). En ambos grupos el descenso más importante de la MFI de la IL-15 se dio 90 días tras cada uno de los tres ciclos de tratamiento.

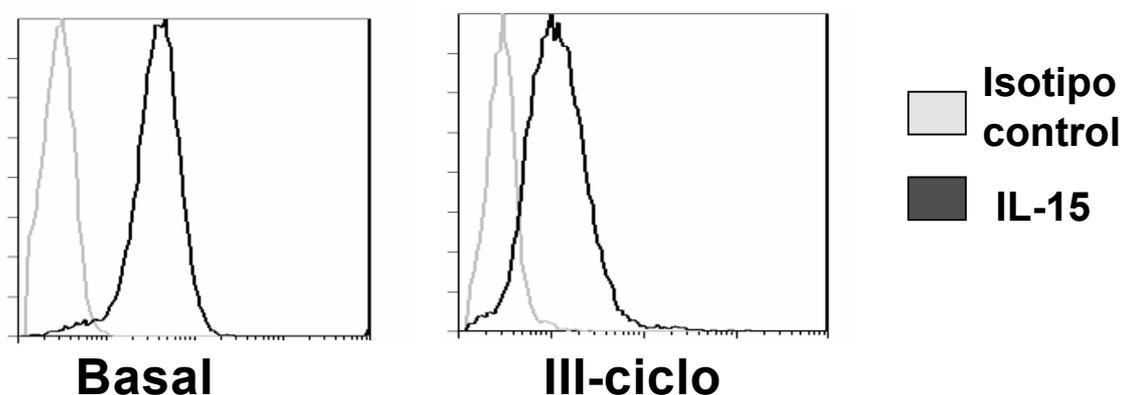


Figura 30. **Expresión de IL-15 transmembrana al inicio y tras el tercer ciclo.** La línea gris corresponde al isotipo control y la negra a la tinción específica con anti-IL15 en la superficie de monocitos seleccionados como CD14+. En un enfermo representativo se observó una disminución en la MIF de IL-15 antes del tratamiento y 90 días después de la primera infusión del tercer ciclo de tratamiento.

## Cambios en la ratio de células T helper y citotóxicas de memoria y naïve en los pacientes serIL15+ y serIL15-

Una de las funciones principales de la IL-15 es la de la supervivencia de las células T de memoria, por lo que si disminuye la IL-15 deberían disminuir las mismas.

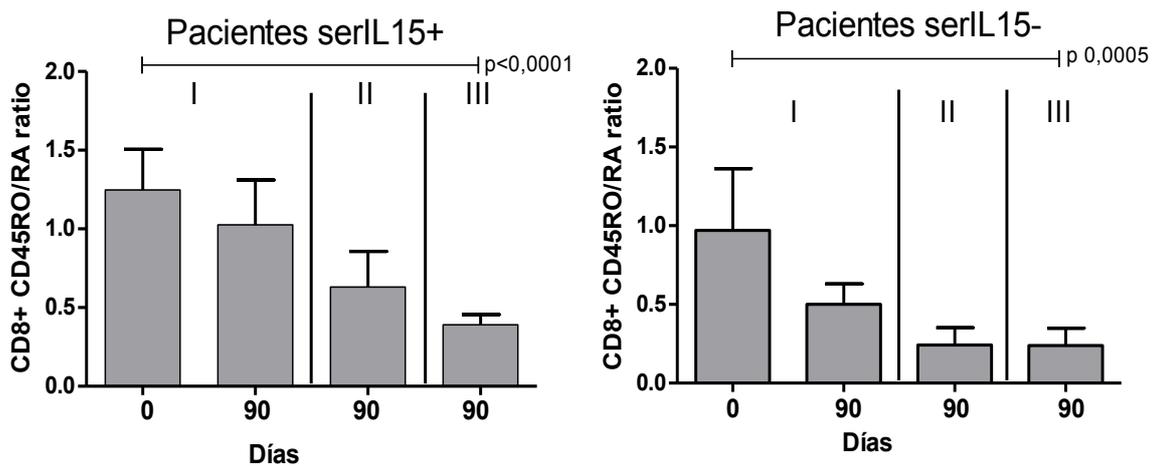


Figura 31. **Evolución de la ratio de células T CD8+ memoria/naïve en pacientes serIL15+ y serIL15- tras el tratamiento con rituximab.** Para determinar la ratio entre células T citotóxicas y naïve se dividió el número de células de memoria (RO+RA-) entre el número de células naïve. (RO-RA+). Se analizó la evolución en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 23 enfermos, el segundo 20 y el tercero 17. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

Como se observa en la figura, en nuestros pacientes hay una disminución estadísticamente significativa de la ratio células de memoria/naïve. El hecho que disminuyan tanto en los pacientes serIL15+ como los serIL15- nos hace pensar que, como mínimo, en estos últimos el cambio de la ratio sea secundario a la disminución de la IL-15 transmembrana.

### 8.3.6 IL-17

En diversos estudios se ha demostrado que la IL-15 tiene la capacidad de inducir un aumento de otras citoquinas proinflamatorias, entre ellas la IL-17. Por este motivo analizamos los niveles de IL-17 en nuestros enfermos.

Los enfermos con AR presentaron niveles de IL-17 superiores a los donantes controles ( $44,56 \pm 11,97$  vs  $1012,56 \pm 278,74$ ;  $p < 0,007$ )

Los niveles de IL-15 e IL-17 se correlacionaron significativamente tras el tratamiento con rituximab ( $R=0,5217$ ,  $p < 0,0001$ ).

Se observó también que los enfermos serIL15+ presentaban mayores niveles de IL-17 que los enfermos serIL15- en suero ( $1196,9 \pm 203$  vs  $414,7 \pm 202$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0,0411$ ).

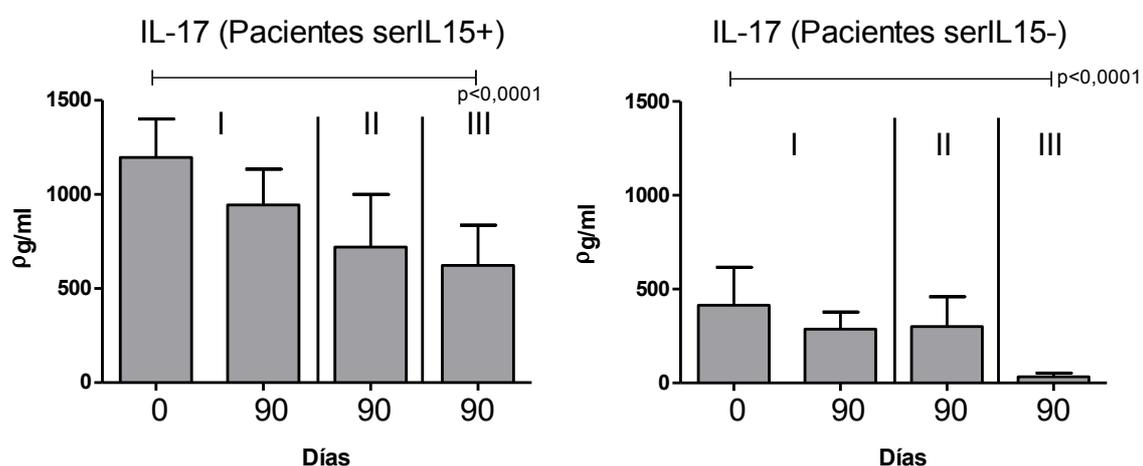


Figura 32. Evolución de los niveles de IL-17 en suero en los pacientes tratados

**con rituximab.** Se determinó el nivel de IL-17 ( $\mu\text{g/ml}$ ) mediante técnica de ELISA (PreproTech Cat. 900-M84) en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Se escogió el tiempo de 90 días por ser cuando se observó un mayor descenso. Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 23 enfermos, el segundo 20 y el tercero 17. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

En los dos grupos de pacientes se observó una disminución de IL-17 estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). En los enfermos serIL15+ el descenso fue más pronunciado.

En los enfermos serIL15- la disminución a los 90 días tras el primer y segundo ciclo el descenso fue inferior, aumentando claramente tras el tercer ciclo.

### 8.3.7 Células T reguladoras

Múltiples estudios han demostrado que el desarrollo y la evolución tanto de las células Th17 como las células T reguladoras en los enfermos con artritis reumatoide vienen determinados por los cambios en distintas citoquinas. Los cambios encontrados tanto en la IL-15 como en la IL-17 en nuestros enfermos tras el tratamiento con rituximab deberían influir en los niveles de células T reguladoras.

A pesar de ello, en un estudio de 17 pacientes con AR a los que se trató con rituximab y que se siguieron durante 12 meses las células T reguladoras se mantuvieron estables [222].

En nuestros pacientes se observó una correlación inversa entre los niveles de IL-17 y los de los linfocitos T reguladores (CD4+CD25++CD127-) ( $R = -0,3427$ ;  $p = 0,03$ ) tras el tratamiento con rituximab.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles iniciales de células T reguladoras al comparar entre enfermos con IL-15 presente en suero y los que no ( $0,031 \pm 0,01$  vs  $0,05 \pm 0,01$ , respectivamente)

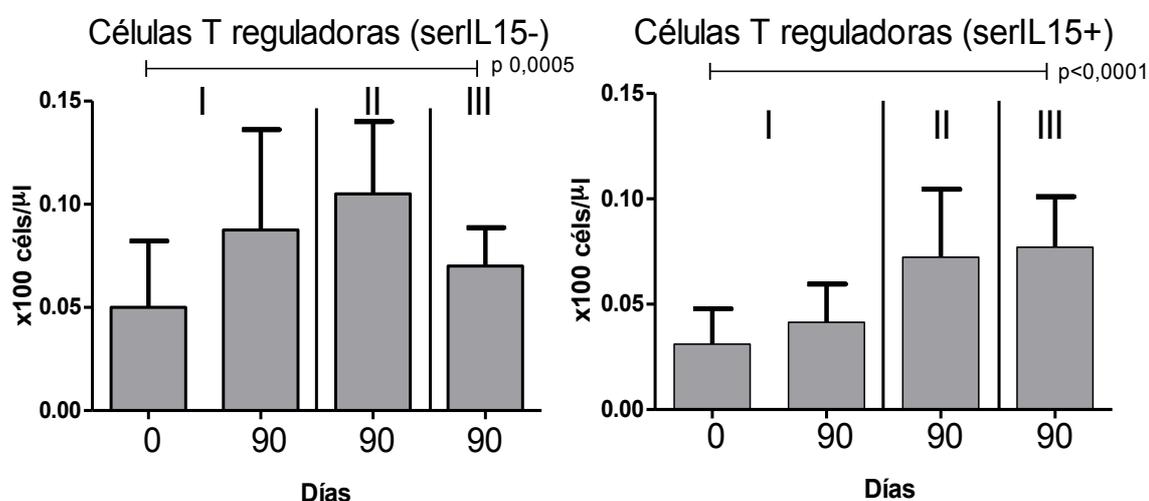


Figura 33. Evolución de las células T reguladoras en los pacientes tras el

**tratamiento con rituximab.** Para determinar la concentración de células T reguladoras

(CD3+CD25++CD127-) se utilizó su porcentaje sobre el total de linfocitos y el número total de linfocitos a partir de los resultados de rutina realizados por el laboratorio central. Se indican los valores de linfocitos T reguladores en los pacientes en los tres ciclos de administración de rituximab (I, II, III). Los valores se expresan como la media más la barra de error correspondiente al error estándar de la media. Iniciaron el primer ciclo 23 enfermos, el segundo 20 y el tercero 17. Se realizó una ANOVA para determinar si había diferencias entre las medias en los distintos tiempos.

Tanto en los pacientes serIL15+ como en los pacientes serIL15- se observó un aumento estadísticamente significativo de células T reguladoras tras el tratamiento con rituximab.

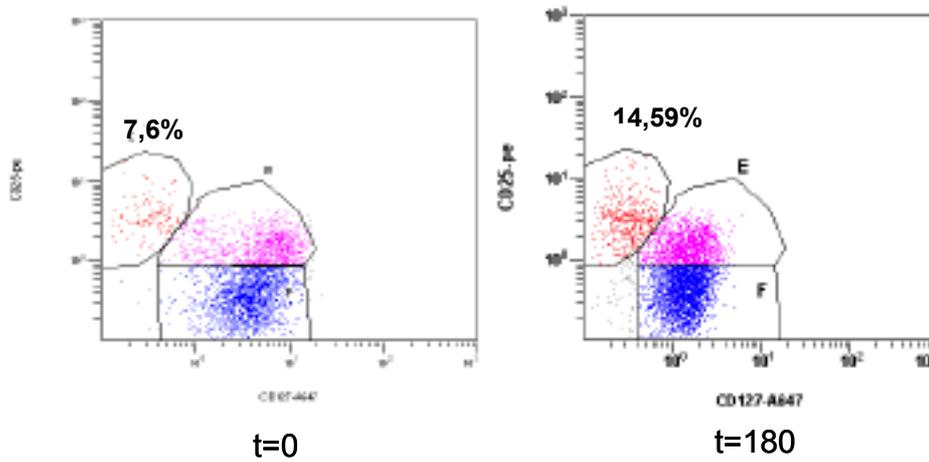


Figura 34. **Evolución de las células T reguladoras en un paciente representativo serIL15-**. Se observa como a los 180 días el porcentaje de células T reguladoras aumenta, pasando de un 7,6% a un 14,59%.

### 8.3.8. Niveles de rituximab

#### Niveles de rituximab en el tiempo

Los niveles máximos de rituximab se observaron 30 días después de la primera infusión.

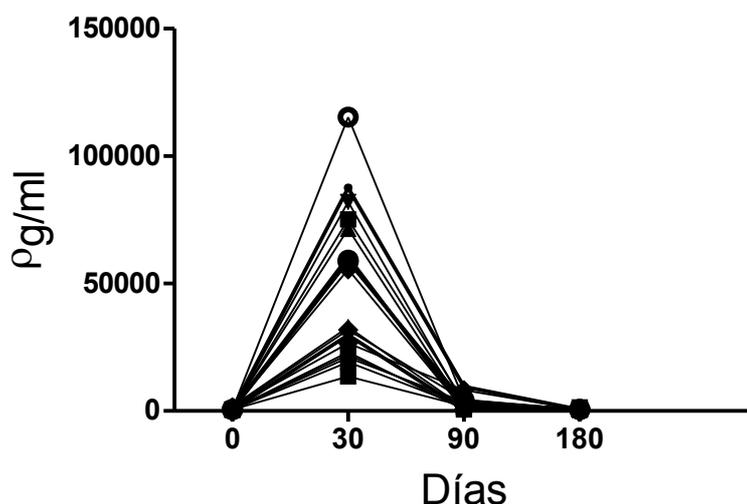


Figura 35. Evolución de los niveles de rituximab en suero, basales y a los 30, 90 y 180 días.

Los niveles máximos fueron muy variables, con un mínimo de 13000 hasta un máximo de 115000 pg/ml. A los 90 días habían descendido de manera importante, pero eran detectables todavía en un 80% de los pacientes.

Los pacientes con niveles más elevados tras el primer ciclo presentaron también niveles más elevados en los siguientes ciclos.

#### Asociación entre los niveles de rituximab y la actividad clínica y la deplección de células B.

Para poder analizar la asociación entre los niveles de rituximab y parámetros clínicos o de laboratorio se clasificó a los pacientes en dos grupos: pacientes con niveles de rituximab superiores a 56000 pg/ml (Grupo A; 52% de los pacientes) y pacientes con niveles inferiores (Grupo B; 48% de los pacientes). Las características de los pacientes de los dos grupos eran comparables al inicio del tratamiento. En la tabla se observan los decrementos de los valores clínicos y analíticos al inicio y a los 180 días de tratamiento.

Tabla 25. Decrementos de los valores clínicos y analíticos a los 180 días del tratamiento

|  | Grupo A<br>(>56000 $\mu\text{g/ml}$ ) | Grupo B<br>(<56000 $\mu\text{g/ml}$ ) | P     |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
| ▼ <sub>180</sub> DAS28                   | 1,7±1,3                               | 1,7±1                                 | 0,96  |
| ▼ <sub>180</sub> VSG (mm/h)              | 9,1±9,1                               | 37,1±8                                | 0,038 |
| ▼ <sub>180</sub> PCR (mg/L)              | 36,9±8,5                              | 36,7±25,3                             | 0,9   |
| ▼ <sub>180</sub> IgG (mg/dl)             | 3±3,6                                 | 23,3±6,9                              | 0,018 |
| ▼ <sub>180</sub> IgA (mg/dl)             | 0,8±16,3                              | 16,3±22,6                             | 0,092 |
| ▼ <sub>180</sub> IgM (mg/dl)             | 24,2±4,5                              | 39,2±4,2                              | 0,03  |
| ▼ <sub>180</sub> FR (UI/ml)              | 56,7±6,4                              | 53,3±10,9                             | 0,7   |
| ▼ <sub>180</sub> C3 (mg/dl)              | -13±4,7                               | 6±3,7                                 | 0,005 |
| ▼ <sub>180</sub> C4 (mg/dl)              | -20±4,6                               | -3,7±7,8                              | 0,07  |
| Células B a los 180 días<br>(células/ml) | 9,7±3,2                               | 1,3±0,4                               | 0,03  |

A pesar de que a los 180 días la mejoría clínica era prácticamente idéntica no ocurre lo mismo a los 90 días. En el corte a los 3 meses se observa que los pacientes del grupo B presentaban una mejoría del DAS28 un 32% superior a los del grupo A (1,22 vs 1,62), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Se observó que un 63,4% de los pacientes del grupo A consiguió respuesta EULAR por un 88,9% de los pacientes del grupo B, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

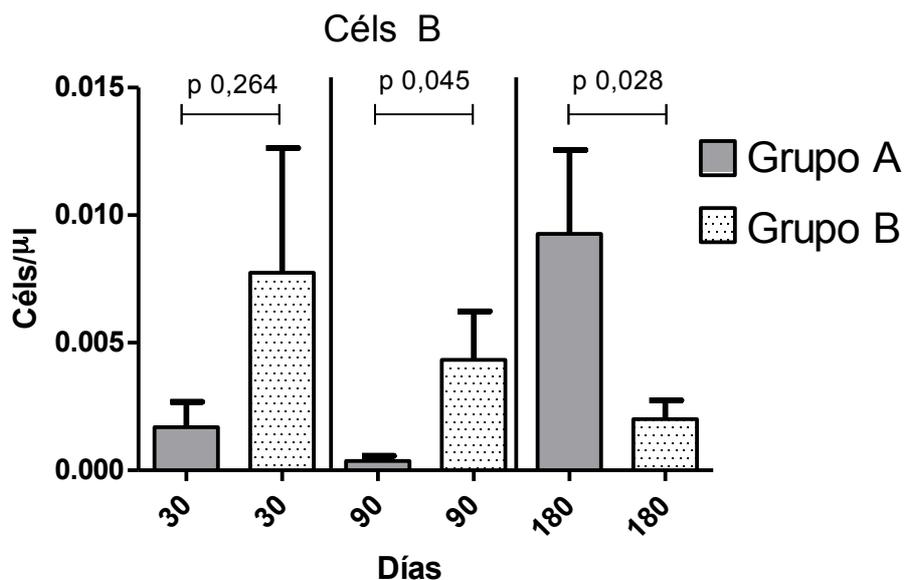


Figura 36. Número de células B en sangre periférica tras el tratamiento con rituximab en el grupo A y en el grupo B

La evolución de linfocitos B fue distinta entre los dos grupos. En el grupo A se encontró una mayor deplección inicial que se mantuvo a los 90 días respecto al grupo B. En cambio a los 6 meses el número de células B fue más elevado en el grupo A. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativa a los 90 (p 0,045) y 180 días (p 0,028).

Ciento ochenta días después de la primera infusión un 20% de los pacientes del grupo A presentaba niveles de células B inferiores a 1 célula/ml por un 44,4% del grupo B.

### Niveles de anticuerpo antirituximab

No se detectaron anticuerpos anti-RTX en ningún paciente durante la totalidad del seguimiento.

## 9. Discusión

En este trabajo estudiamos los cambios en los linfocitos T tras la depleción de las células CD20+ durante tres ciclos de rituximab en enfermos con AR e intentamos conocer los mecanismos que explican estos cambios. Determinamos, además, los niveles de RTX en suero y su relación tanto con la clínica como con los niveles de linfocitos B.

El sistema inmune es un complejo entramado de distintos tipos celulares y moleculares encargados de la defensa de nuestro organismo ante agentes infecciosos. Los cambios o alteraciones de alguno de sus componentes provocan cambios, de mayor o menor importancia, en los otros elementos del sistema inmunológico.

Por tanto, es lógico proponer que la depleción de los linfocitos CD20+ con RTX debería provocar modificaciones en los otros compartimentos del sistema inmunológico.

Hasta la actualidad los artículos publicados muestran básicamente los efectos del tratamiento con rituximab sobre las células B, las inmunoglobulinas o los autoanticuerpos [169-173,182]. Los estudios que buscan los efectos de rituximab más allá de la consecuencia directa de la deplección son estudios en tejido sinovial y como máximo hasta 6 meses después de la primera infusión del fármaco. Sólo hemos encontrado un único estudio previo que buscara más allá de la célula B en sangre periférica y además solo es de 12 semanas de duración [220].

Lo ideal sería poder tener resultados de sinovia y sangre periférica a la vez, ya que el comportamiento y el fenotipo de las células que los habitan son distintos, pero en nuestro caso nos fue imposible conseguir biopsias de tejido sinovial. Inicialmente intentamos realizar estudio también en líquido sinovial, pero la buena respuesta al tratamiento impidió que consiguiéramos un número suficiente de muestras y debimos desestimarlos.

En los enfermos con AR, la ausencia o intensa disminución de linfocitos B producida por rituximab va más allá del primer ciclo, por lo que es importante conocer si los cambios iniciales se mantienen, se transforman o aparecen otros a más largo término. Sabemos que el sistema inmune tiene unos mecanismos de autoregulación que pueden comportarse de manera distinta ante cambios continuados.

Por ejemplo, una de las mayores preocupaciones sobre el tratamiento con rituximab es la disminución de las inmunoglobulinas, pero no solo tras el primer ciclo de rituximab, sino, especialmente, tras ciclos repetidos de rituximab [223]

En nuestro caso, como en estudios previos, se observó una mayor disminución de IgM que de las otras inmunoglobulinas, seguida de la disminución de IgG. En nuestro caso se observó una mayor disminución de IgA que las que se ha observado hasta ahora, aunque la comparación es difícil, ya que los estudios realizados únicamente contabilizan el porcentaje de enfermos con concentraciones inferiores a la de los rangos de normalidad [197,199,216].

Existen otras enfermedades sistémicas autoinmunes en las que se ha profundizado más en el estudio de los cambios provocados por rituximab [207,224-226]

En la mayoría de estas enfermedades se observa que rituximab no provoca un cambio en el número total de las células T, pero provoca un descenso de las células T activadas y de memoria y un aumento de las células T reguladoras. De todas formas, el comportamiento ante el tratamiento con rituximab puede diferir entre las distintas enfermedades, además de que las dosis utilizadas en la artritis reumatoide son diferentes.

Estudios previos ya demostraron que el porcentaje de células T de memoria es mayor en los enfermos con AR que en controles sanos y que este porcentaje se correlaciona con el proceso inmune y con las manifestaciones clínicas [227] [228].

Nuestros resultados, muestran que a pesar de que tras el tratamiento con rituximab no varían los números totales de células T o de células CD4+ o CD8+ hay cambios significativos en cuanto a distintas subpoblaciones. Es de especial interés el aumento de las células T reguladoras y la disminución de la ratio entre las células de memoria/células naïve. Estos cambios se correlacionan en distinto grado con el DAS28 y otros parámetros clínicos. Por lo tanto podrían explicar la lenta pero progresiva respuesta clínica a rituximab a pesar de la rápida deplección de las linfocitos B.

La disminución de la IL-15 podría ser un factor que podría participar en este proceso cambiante y progresivo. Esta disminución podría estar implicada en ir reduciendo el porcentaje de células T de memoria, que repercutirían a largo plazo en el perfil de los linfocitos T y las posteriores modificaciones que explicarían los cambios observados.

En este trabajo demostramos que el tratamiento con RTX disminuye tanto los niveles séricos como en membrana de IL-15. El RNAm de la IL-15 se expresa de manera constitutiva en distintos tejidos y células humanas, como monocitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, fibroblastos del bazo, encía y piel [229]. Según publicaciones recientes parece que las células B tienen la capacidad de producir una pequeña cantidad de IL-15 [230]. Sin embargo los niveles producidos son tan pequeños que es improbable que la disminución de IL-15 en los enfermos tratados con RTX sea exclusivamente debida a la depleción de las células B. Lo más probable es que la disminución de IL-15 sea secundaria a los cambios provocados en la regulación de las células del sistema inmune innato y otras citoquinas.

Se ha demostrado que para la óptima inducción de la producción de IL-15, el monocito o el macrófago deben estar impregnados de IFN- $\alpha$ , y que la IL-10 tiene la capacidad de aumentar la expresión del RNA m de IL-15 en los monocitos/macrófagos [255].

Diversos estudios han correlacionado los niveles de IL-15 con la severidad de la AR [231]. Los enfermos con AR presentan niveles más elevados de IL-15 que los enfermos con LES, SS o controles sanos, y en casos de artritis temprana, niveles elevados de IL-15 predicen una enfermedad más severa [221,232].

La IL-15 podría estar en el ápex de una cascada de determinados factores inflamatorios, y por tanto una disminución de esta interleucina causada por la acción de RTX tendría múltiples beneficios en los enfermos con AR.

En un modelo con ratones se ha observado que el bloqueo de la IL-15 provoca una inhibición de la interacción entre la célula T CD4+ y la célula B con la consecuente disminución en la producción de anticuerpos anticógeno [233].

Nosotros hemos detectado que la disminución de IL-15 se asocia a parámetros relevantes en la patología de la artritis. En nuestra cohorte de pacientes hemos observado una asociación entre la progresiva reducción de IL-15 y de IL-17 tras la administración de RTX. La interacción entre estas dos citoquinas es ampliamente conocida en patologías inflamatorias crónicas y en modelos experimentales de inflamación. Así, se ha demostrado que en los linfocitos T sinoviales de enfermos con AR la IL-15 induce, entre otras citoquinas, la producción de IL-17 [234]. También se ha descrito como la ciclosporina en la AR actúa sobre células T inhibiendo la producción de IL-17 inducida por IL-15 [235]. Además se ha observado in vitro que las células dendríticas (DC) que provienen de la estimulación de GM-CSF e IL-15 se diferencian a IL-15-DC. Estas células al ser estimuladas vía TLR producirán IL-17 [236].

En modelos murinos se ha visto que la IL-15 tiene la capacidad de provocar un aumento de la producción de IL-17 por parte de las células CD4+ o de células de nódulos linfáticos cercanos a la artritis y en cambio el tratamiento con anti-IL15 la disminuye [237,238].

A partir de aquí la IL-17 sola o en combinación con TNF- $\alpha$  o IL-1 inducirán la síntesis de más citoquinas proinflamatorias (IL-6 y IL-8) y quemoquinas (MCP-1,2) que provocarán aún más infiltración e inflamación tisular.

En nuestro estudio hemos observado que los cambios en la IL-15 y en la IL-17 van más allá de las funciones directas de estas citoquinas. La reducción de IL-15 e IL-17 se correlacionan con cambios en subpoblaciones de linfocitos T relevantes en la patología de la AR.

Nosotros hemos observado que la reducción de IL-15 secundaria al tratamiento con RTX se asocia a un incremento progresivo del porcentaje de células Treg, inclinando la defectuosa balanza entre células reguladoras y células de respuesta de estos pacientes hacia un estado de mayor regulación [239]. Al mismo tiempo, el incremento de células Treg se podría explicar también por un efecto de la reducción de IL-17. Sea por la disminución de IL-15, de IL-17 o sea por la disminución de ambas, el tratamiento con RTX corrige el balance de células reguladoras y de respuesta alterado en la AR.

La IL-15 aumenta la supervivencia de las células T de memoria, lo que permite el mantenimiento de una respuesta a largo término y más eficaz de estas células T [240,241]. En la AR también se ha demostrado este papel básico de la IL-15, en especial si la transpresentación es realizada por fibroblastos sinoviales [242-245].

Nuestros resultados muestran que independientemente de los cambios en los niveles de IL-15 en suero, la ratio CD45RO+/CD45RA+ disminuye como consecuencia de la reducción de la transpresentación de IL-15. En trabajos muy recientes se resalta el papel de la transpresentación de IL-15 por IL-15RA en la proliferación de células de memoria [246].

La reducción de transpresentación de IL-15 que hemos observado podría explicar porque la disminución de la ratio de células CD8+ CD45RO+/CD45RA+ se observa tanto en los pacientes que presentan IL-15 en suero como en los que no tienen IL-15. Lo que desconocemos es si el descenso de IL-15 transmembrana es secundario a una menor expresión de la cadena IL-15R $\alpha$  o a un descenso en la producción de IL-15.

La IL-15 es transpresentada a través de la unión en la superficie celular con IL-15R $\alpha$ . Por lo tanto, el periodo en el que hay mayor señalización de IL-15 es cuando esta presentación se realiza de célula a célula, como por ejemplo cuando interacciona una célula presentadora de antígenos con la célula T [247-249].

Tanto en el LES como en la AR los niveles elevados de IL-15 y un número más alto de células T CD8+ de memoria se correlacionan con la actividad de la enfermedad [250]. Es más, la neutralización de IL-15, soluble o transmembrana, consigue una mejoría clínica del LES, pero sin cambios significativos en las células T CD8+ de memoria.

Aunque en nuestro estudio no analizamos el estado de activación de las células T CD8+ de memoria tras el tratamiento con RTX, hay publicaciones previas que demuestran que la IL-15 estimula a las células T CD8+ de memoria in vivo [251].

En otros estudios con modelos experimentales se ha visto que la sobreexpresión de IL-15 se asocia con un aumento en la población de células NK, lo que induce una respuesta inmune innata [252]

En cambio, en nuestros pacientes, a pesar de la reducción progresiva de la IL15, se observa un aumento de células NK. Podría ser que este aumento inicial de células NK fuera debido a una reconstitución homeostática que se daría tras la deplección de células B [253,254]. Existen otras posibles explicaciones. Por ejemplo que la reducción de IL-15 inducida por RTX afecte a una subpoblación de células NK o a las células NK más eficientes más que al recuento total de las mismas [255].

Al contrario de lo descrito en ensayos y series previas, nuestros pacientes presentaban un bajo porcentaje de cotratamiento con FAMEs (44,4%), especialmente MTX (33%). El motivo de ello era el largo tiempo de evolución de la enfermedad de nuestros enfermos (15,7 años) y por tanto el largo tiempo de exposición a efectos secundarios de estos FAMEs. Debido a que rituximab fue la primera terapia biológica disponible tras la irrupción de los anti-TNF, todos aquellos pacientes en los que ya habían fracasado las terapias anti-TNF eran candidatos a tratarse con rituximab. Hay que destacar que estos enfermos, en su mayoría padecían enfermedades más agresivas y de un mayor tiempo de evolución, por lo que esta población es poco comparable con la de los ensayos clínicos o estudios publicados hasta el momento [256]. Basándonos en criterios clínicos, solo aquellos pacientes que estaban tomando FAMEs al inicio del tratamiento continuaron con ellos tras el inicio del tratamiento con RTX. A pesar de la posible influencia de los FAMEs en la respuesta inmune, no encontramos diferencias en la regulación de IL-15 entre los pacientes en monoterapia con rituximab y los cotratados con FAMEs.

Todos estos resultados demuestran que la terapia con RTX va más allá de la deplección de células B, a través de mecanismos que empezamos a conocer y a través de mecanismos todavía desconocidos.

Nuestros hallazgos, a la vez, apoyan resultados anteriores que sugieren la continua mejoría de los pacientes con AR tras ciclos repetidos de tratamiento con RTX [198].

En datos previos de otras patologías tratadas con RTX, como el linfoma no Hodgkin, los niveles más bajos de RTX se relacionaron con una respuesta disminuida al tratamiento [257].

En AR existen tres estudios que analizan la relación entre los niveles en suero de rituximab, la respuesta al fármaco y la depleción de linfocitos B conseguida. En el primero y más extenso se incluyeron 58 enfermos y se observó, como en nuestros enfermos, una gran variabilidad en los niveles de RTX en el suero con el nivel máximo a las 4 semanas. En este estudio no se observó, ninguna relación entre los niveles de rituximab ni con la respuesta clínica ni con la depleción de células B sinoviales. En él, 5 de los 58 pacientes presentaron anticuerpos antiRTX y en estos cinco enfermos se observaron niveles de RTX inferiores, aunque sin observarse repercusión clínica [258]. Otro trabajo del mismo grupo demostró también la falta de asociación entre la progresión radiológica de la enfermedad y los niveles de RTX [204].

En el tercer estudio, en el que se incluyeron 29 enfermos, se analizó la relación entre los niveles de RTX y los niveles de linfocitos B en sangre. Como en nuestros pacientes, se observó que a las 4 y 12 semanas aquellos enfermos en los que se consiguieron niveles más elevados de RTX eran los que consiguieron una mayor depleción de linfocitos B periféricos. En este estudio no se mostraron resultados más allá de las 12 semanas [202]. Es a partir de este momento en el que nosotros observamos que se inicia la repoblación periférica de células B en aquellos pacientes con niveles más altos de RTX.

En la AR, los linfocitos B más activos son aquellos que encontramos protegidos en los centros germinales de los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo o en estructuras que se asemejan, como pueden ser los agregados linfocitarios de la sinovia de los pacientes con AR. Estas células suelen ser células B de memoria y están rodeadas de un ambiente que favorece su estimulación y supervivencia [181]

Se ha demostrado que tras la infusión de RTX, este se localiza rápidamente en el bazo y en menor cantidad en la médula ósea [205,259]. Esto explicaría porque en las autopsias de enfermos con linfoma no Hodgkin, hay una depleción total de células B en el bazo y no en otros compartimentos [174]. A las 24 horas RTX se localiza en su mayoría en la glándula tiroides y a partir de aquí se distribuye por el resto del cuerpo de manera variable [205,259].

Nosotros proponemos que debido a la complejidad en la distribución de rituximab por los distintos compartimentos provocaría diferencias entre los distintos pacientes que explicaría la alta variabilidad de los niveles de RTX en suero. La distribución de RTX por los compartimentos extravasculares determinaría una menor depleción periférica a

corto plazo, pero al ser más efectiva en los centros germinales provocaría una mayor disminución de las inmunoglobulinas y una repleción periférica más retardada. En cambio, en los enfermos con menos penetración de RTX en los compartimentos celulares, la depleción periférica inicial sería más efectiva, pero al afectar menos a las células B de los centros germinales, la repleción posterior sería más rápida. Esta podría ser la causa que explicaría porque los enfermos con niveles más bajos de rituximab no presenten una peor respuesta al tratamiento.

En resumen, para evaluar el impacto global de RTX en la respuesta inmune, es básico considerar sus consecuencias más allá de la depleción de las células B. Algunos de estos mecanismos están mediados por la IL-15 a través de su extensa pleiotropía; la reducción de IL-15 podría afectar la maduración funcional de macrófagos y células dendríticas, la actividad fagocítica de monocitos macrófagos y la inducción de factores proinflamatorios como la IL-8 y MCP-1. Algunos de estos mecanismos podrían estar alterados en enfermos con AR. Reduciendo la IL-15, RTX podría contener estos efectos.

Además, una mejor distribución de RTX en los tejidos periféricos, especialmente ganglios linfáticos y tejido sinovial con agregados linfoides, permitirá una mejor depleción de linfocitos B de memoria y/o activados lo que a la larga provocaría una depleción más duradera y posiblemente una mejor respuesta clínica a largo término.



## 10. Conclusiones

1. Rituximab es eficaz clínicamente y en la depleción de células B periféricas a lo largo de los tres ciclos de tratamiento. Existen parámetros inmunológicos que se asocian a la mejoría de la enfermedad.
2. El efecto de RTX se observa, además de sobre las células B, en la disminución tanto de los niveles de inmunoglobulinas como en los niveles de autoanticuerpos.
3. El pico de respuesta clínica y el momento de un mayor cambio en la mayoría de los parámetros inmunológicos estudiados se da a los 90 días del tratamiento. En pocos parámetros se observa un mayor cambio a los 180 días.
4. El tratamiento con RTX no altera el número total ni el porcentaje de células T en sangre periférica.
5. Sin embargo, provoca indirectamente una disminución de la ratio entre células T de memoria y naïve que se correlaciona con la respuesta clínica medida por DAS28.
6. Aunque en sólo dos terceras partes de los pacientes se detectaba IL-15 en suero antes del tratamiento con rituximab, todos los enfermos presentaron IL-15 en la membrana de los monocitos, aunque con niveles variables.
7. Los niveles de IL-15 en suero e IL-15 transmembrana disminuyen con el tratamiento con rituximab en todos los pacientes. Aunque se desconoce el mecanismo, el carácter progresivo de la disminución sugiere que se trate de un mecanismo indirecto.

8. La IL-15 en suero se correlaciona con la IL-17. El tratamiento con rituximab provoca un descenso de los niveles de IL-17 en suero estadísticamente significativo en prácticamente todos los pacientes. Como consecuencia está disminución se correlaciona negativamente con los niveles de células T reguladoras. A lo largo del tratamiento se observa un aumento de las células T reguladoras en los pacientes serIL15+ y serIL15-.
9. Los niveles de rituximab detectados en suero tras la primera infusión fueron muy variables entre los enfermos. El momento en que se encontró un nivel más alto fue a los 30 días. A los 90 días los niveles habían disminuido notablemente.
10. Los enfermos con niveles más altos de rituximab en suero consiguen una depleción de células B a los 30 y 90 días más efectiva, pero la repleción ocurre antes. Sin embargo, no se han encontrado diferencias clínicas entre los enfermos con niveles altos y con niveles bajos de rituximab.

## 11. Bibliografía

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.
2. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:88-95.
3. Rothschild BM, Turner KR, DeLuca MA. Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the late archaic period of Alabama. *Science* 1988;241:1498-501.
4. Garrod A. *Treatise on gout and rheumatic gout*. London, 1876.
5. Ansar Ahmed S, Dauphinee MJ, Talal N. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *J Immunol* 1985;134:204-10.
6. Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum* 2004;50:3458-67.
7. Jawaheer D, Lum RF, Gregersen PK, Criswell LA. Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3087-94.
8. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: Results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32:903-7.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43:30-7.
10. Fries JF, Wolfe F, Apple R, *et al.* HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002;46:2320-9.
11. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, *et al.* Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005;52:3433-8.
12. de Juan MD, Belmonte I, Barado J, *et al.* Differential associations of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: High frequency of DR1 and DR10 and lack of association with HLA-DR4 or any of its subtypes. *Tissue Antigens* 1994;43:320-3.
13. Delgado de la Poza JF, Cantó E, Diaz-Torne C, *et al.* Contribución del polimorfismo en el gen IL1RB1 y el epítipo compartido a la artritis reumatoide. *Inmunología* 2011;30:108-14.
14. Fu XT, Bono CP, Woulfe SL, *et al.* Pocket 4 of the HLA-DR(alpha,beta 1\*0401) molecule is a major determinant of T cell recognition of peptide. *J Exp Med* 1995;181:915-26.
15. de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Lett* 2011;585:3619-26.
16. Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA-DR4, HLA-DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1988;27:367-71.
17. Rak JM, Maestroni L, Balandraud N, *et al.* Transfer of the shared epitope through microchimerism in women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:73-80.
18. Zernakova A, Stahl EA, Trynka G, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet*;7:e1002004.
19. Lie BA, Viken MK, Odegard S, *et al.* Associations between the PTPN22 1858C>T polymorphism and radiographic joint destruction in patients with rheumatoid arthritis: Results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1604-9.
20. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357:977-86.
21. Karlson EW, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum* 1999;42:910-7.
22. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 1996;39:732-5.
23. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006;54:38-46.
24. Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, *et al.* Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: A nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum* 2007;56:1446-53.

25. Criswell LA, Merlino LA, Cerhan JR, *et al.* Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: Results from the iowa women's health study. *Am J Med* 2002;112:465-71.
26. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in bal cells. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1488-92.
27. Schrijver IA, Melief MJ, Tak PP, Hazenberg MP, Laman JD. Antigen-presenting cells containing bacterial peptidoglycan in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients coexpress costimulatory molecules and cytokines. *Arthritis Rheum* 2000;43:2160-8.
28. Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:779-87.
29. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: The humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004;28:311-8.
30. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*;7:569-78.
31. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and iga rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741-9.
32. Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, *et al.* Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *J Rheumatol* 2002;29:2278-87.
33. Randen I, Thompson KM, Pascual V, *et al.* Rheumatoid factor v genes from patients with rheumatoid arthritis are diverse and show evidence of an antigen-driven response. *Immunol Rev* 1992;128:49-71.
34. Thompson KM, Randen I, Borretzen M, Forre O, Natvig JB. Variable region gene usage of human monoclonal rheumatoid factors derived from healthy donors following immunization. *Eur J Immunol* 1994;24:1771-8.
35. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998;101:273-81.
36. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW, *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum* 2009;60:1923-31.
37. Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, *et al.* The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis Rheum*;62:3161-72.
38. Athanasou NA, Quinn J. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: Phenotypic relation to other marrow derived cells. *Ann Rheum Dis* 1991;50:311-5.
39. Lalor PA, Mapp PI, Hall PA, Revell PA. Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by a monoclonal antibody, ki67. *Rheumatol Int* 1987;7:183-6.
40. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:289-95.
41. Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 1994;37:212-20.
42. Thomas R, Lipsky PE. Presentation of self peptides by dendritic cells: Possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:183-90.
43. Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, *et al.* An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996;16:53-60.
44. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943-51.
45. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, *et al.* Activated human t cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: Possible role of t cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:1003-12.
46. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, *et al.* Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217-25.

47. van de Sande MG, de Hair MJ, Schuller Y, *et al.* The features of the synovium in early rheumatoid arthritis according to the 2010 acr/eular classification criteria. *PLoS One*;7:e36668.
48. MacDonald KP, Nishioka Y, Lipsky PE, Thomas R. Functional cd40 ligand is expressed by t cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1997;100:2404-14.
49. Maxwell LJ, Singh JA. Abatacept for rheumatoid arthritis: A cochrane systematic review. *J Rheumatol* 2010;37:234-45.
50. Schett G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Osteoclasts. Arthritis Res Ther* 2007;9:203.
51. Boumans MJ, Tak PP. Rituximab treatment in rheumatoid arthritis: How does it work? *Arthritis Res Ther* 2009;11:134.
52. Calero I, Nieto JA, Sanz I. B cell therapies for rheumatoid arthritis: Beyond b cell depletion. *Rheum Dis Clin North Am*;36:325-43.
53. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory b cells in autoimmune diseases: How do they work? *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:260-7.
54. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human b cell effector cytokines: A role in immune regulation? *J Immunol* 2004;172:3422-7.
55. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is b cell dependent. *J Immunol* 2001;167:4710-8.
56. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, *et al.* Cd20 deficiency in humans results in impaired t cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*;120:214-22.
57. Takemura S, Braun A, Crowson C, *et al.* Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001;167:1072-80.
58. Gause A, Gundlach K, Carbon G, Daus H, Trumper L, Pfreundschuh M. Analysis of vh gene rearrangements from synovial b cells of patients with rheumatoid arthritis reveals infiltration of the synovial membrane by memory b cells. *Rheumatol Int* 1997;17:145-50.
59. Souto-Carneiro MM, Krenn V, Hermann R, Konig A, Muller-Hermelink HK. Ighv genes from different anatomical regions, with different histopathological patterns, of a rheumatoid arthritis patient suggest cyclic re-entry of mature synovial b-cells in the hypermutation process. *Arthritis Res* 2000;2:303-14.
60. Voswinkel J, Weisgerber K, Pfreundschuh M, Gause A. The b lymphocyte in rheumatoid arthritis: Recirculation of b lymphocytes between different joints and blood. *Autoimmunity* 1999;31:25-34.
61. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating b lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 1999;97:188-96.
62. Firestein GS, Xu WD, Townsend K, *et al.* Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect t cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (csf-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 1988;168:1573-86.
63. Raza K, Falciani F, Curnow SJ, *et al.* Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of t cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R784-95.
64. Smeets TJ, Kraan MC, Versendaal J, Breedveld FC, Tak PP. Analysis of serial synovial biopsies in patients with rheumatoid arthritis: Description of a control group without clinical improvement after treatment with interleukin 10 or placebo. *J Rheumatol* 1999;26:2089-93.
65. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, *et al.* Human interleukin-17: A t cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963-70.
66. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Tnf alpha--a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 1992;31:293-8.
67. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, *et al.* Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in european patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum* 2006;54:2817-29.
68. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, *et al.* The role of interleukin-15 in t-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996;2:175-82.
69. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates t cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997;3:189-95.
70. Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsøe B, *et al.* Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2686-92.
71. Szekeanez Z, Koch AE. Vasculogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*;12:110.

72. Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (v $\alpha$ -4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 1992;149:1424-31.
73. Nyhall-Wahlin BM, Turesson C, Jacobsson LT, *et al.* The presence of rheumatoid nodules at early rheumatoid arthritis diagnosis is a sign of extra-articular disease and predicts radiographic progression of joint destruction over 5 years. *Scand J Rheumatol* 2011;40:81-7.
74. Lee HK, Kim DS, Yoo B, *et al.* Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest* 2005;127:2019-27.
75. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, *et al.* Eular evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*;69:325-31.
76. Gomez-Vaquero C, Robustillo M, Narvaez J, *et al.* Assessment of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: Impact of the new eular recommendations on the score cardiovascular risk index. *Clin Rheumatol*;31:35-9.
77. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan 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.
78. Voskuyl AE, Zwinderman AH, Westedt ML, Vandenbroucke JP, Breedveld FC, Hazes JM. Factors associated with the development of vasculitis in rheumatoid arthritis: Results of a case-control study. *Ann Rheum Dis* 1996;55:190-2.
79. Peeters HR, Jongen-Lavrencic M, Raja AN, *et al.* Course and characteristics of anaemia in patients with rheumatoid arthritis of recent onset. *Ann Rheum Dis* 1996;55:162-8.
80. Felty AR. Chronic arthritis in the adult associated with splenomegaly and leucopenia. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1924;35:16-20.
81. Zikou AK, Alamanos Y, Argyropoulou MI, *et al.* Radiological cervical spine involvement in patients with rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *J Rheumatol* 2005;32:801-6.
82. Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R45.
83. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. *Arthritis Rheum* 2002;46:2287-93.
84. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2294-300.
85. van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, *et al.* The effectiveness of early treatment with "Second-line" Antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996;124:699-707.
86. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: The importance of disease duration. *Arthritis Rheum* 2000;43:22-9.
87. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, *et al.* The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
88. Saraux A, Berthelot JM, Chales G, *et al.* Ability of the american college of rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum* 2001;44:2485-91.
89. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An american college of rheumatology/european league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*;69:1580-8.
90. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:196-201.
91. Masi AT, Maldonado-Cocco JA, Kaplan SB, Feigenbaum SL, Chandler RW. Prospective study of the early course of rheumatoid arthritis in young adults: Comparison of patients with and without rheumatoid factor positivity at entry and identification of variables correlating with outcome. *Semin Arthritis Rheum* 1976;4:299-326.
92. Whiting PF, Smidt N, Sterne JA, *et al.* Systematic review: Accuracy of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*;152:456-64; W155-66.
93. Bas S, Genevay S, Meyer O, Gabay C. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, igm and iga rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:677-80.
94. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, van de Putte LB. Radiographic progression on radiographs of hands and feet during the first 3 years of rheumatoid arthritis measured according to sharp's method (van der heijde modification). *J Rheumatol* 1995;22:1792-6.

95. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
96. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, *et al.* A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:244-57.
97. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, *et al.* Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: Validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R796-806.
98. Lard LR, Visser H, Speyer I, *et al.* Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: Comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 2001;111:446-51.
99. Tsakonas E, Fitzgerald AA, Fitzcharles MA, *et al.* Consequences of delayed therapy with second-line agents in rheumatoid arthritis: A 3 year followup on the hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis (hera) study. *J Rheumatol* 2000;27:623-9.
100. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, *et al.* Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:26-34.
101. Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, Nance EP, Pincus T. Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol* 1989;16:585-91.
102. Grigor C, Capell H, Stirling A, *et al.* Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the ticora study): A single-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364:263-9.
103. Puolakka K, Kautiainen H, Mottonen T, *et al.* Impact of initial aggressive drug treatment with a combination of disease-modifying antirheumatic drugs on the development of work disability in early rheumatoid arthritis: A five-year randomized followup trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:55-62.
104. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009;373:659-72.
105. Tornero Molina J, Sanmarti Sala R, Rodriguez Valverde V, *et al.* [update of the consensus statement of the spanish society of rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin*;6:23-36.
106. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, *et al.* Eular recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*;69:964-75.
107. Singh JA, Furst DE, Bharat A, *et al.* 2012 update of the 2008 american college of rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:625-39.
108. Conn DL. Oral glucocorticoids should be included in any recommendation for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of rheumatoid arthritis: Comment on the article by singh *et al.* *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:1622-3; author reply 3-4.
109. Daikh DI, St Clair EW. Updated recommendations for the treatment of rheumatoid arthritis: Another step on a long road. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:648-51.
110. Zhang G, Zhang L, Duff GW. A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (ngre) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol* 1997;16:145-52.
111. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of i kappa b alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-6.
112. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.
113. Karin M, Liu Z, Zandi E. Ap-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240-6.
114. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 2004;50:3408-17.
115. Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: Mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* 1976;84:304-15.
116. Gerrard TL, Cupps TR, Jurgensen CH, Fauci AS. Hydrocortisone-mediated inhibition of monocyte antigen presentation: Dissociation of inhibitory effect and expression of dr antigens. *Cell Immunol* 1984;85:330-9.
117. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in t cell development and function\*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309-45.

118. Slade JD, Hepburn B. Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets. *J Lab Clin Med* 1983;101:479-87.
119. van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz Van Reesema DR, Bijlsma JW. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: Clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 2002;136:1-12.
120. Landewe RB, Boers M, Verhoeven AC, *et al.* Cobra combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: Long-term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis Rheum* 2002;46:347-56.
121. Graudal N, Jurgens G. Similar effects of disease-modifying antirheumatic drugs, glucocorticoids, and biologic agents on radiographic progression in rheumatoid arthritis: Meta-analysis of 70 randomized placebo-controlled or drug-controlled studies, including 112 comparisons. *Arthritis Rheum* 2010;62:2852-63.
122. Gaujoux-Viala C, Smolen JS, Landewe R, *et al.* Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the eular recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1004-9.
123. Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 1996;39:1951-60.
124. Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1189-96.
125. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* 2005;114:154-63.
126. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: Apoptosis and clonal deletion of activated peripheral t cells. *J Clin Invest* 1998;102:322-8.
127. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: A prospective study. *Lancet* 2002;359:1173-7.
128. Fox RI. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1998;53:20-6.
129. Cohen S, Cannon GW, Schiff M, *et al.* Two-year, blinded, randomized, controlled trial of treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with methotrexate. Utilization of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis trial investigator group. *Arthritis Rheum* 2001;44:1984-92.
130. Emery P. Disease modification in rheumatoid arthritis with leflunomide. *Scand J Rheumatol Suppl* 1999;112:9-14.
131. Li EK, Tam LS, Tomlinson B. Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther* 2004;26:447-59.
132. Svartz N. A new sulfanilamide preparation. *Acta Med Scand* 1942;110:11.
133. Smolen JS, Kalden JR, Scott DL, *et al.* Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: A double-blind, randomised, multicentre trial. European leflunomide study group. *Lancet* 1999;353:259-66.
134. Forestier J. Rheumatoid arthritis and its treatment of chronic arthritis. *J Lab Clin Med* 1935
135. Sigler JW, Bluhm GB, Duncan H, Sharp JT, Ensign DC, McCrum WR. Gold salts in the treatment of rheumatoid arthritis. A double-blind study. *Ann Intern Med* 1974;80:21-6.
136. Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, *et al.* Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* 2007;56:544-54.
137. Stuhlmeier KM. The anti-rheumatic gold salt aurothiomalate suppresses interleukin-1beta-induced hyaluronan accumulation by blocking has1 transcription and by acting as a cox-2 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 2007;282:2250-8.
138. Capell HA, Lewis D, Carey J. A three year follow up of patients allocated to placebo, or oral or injectable gold therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986;45:705-11.
139. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hyun S, Klinenberg JR, Stecher V. The effect of hydroxychloroquine therapy on serum levels of immunoregulatory molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;21:375-6.
140. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of tnf-alpha, il-1beta and il-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:703-10.

141. Lafyatis R, York M, Marshak-Rothstein A. Antimalarial agents: Closing the gate on toll-like receptors? *Arthritis Rheum* 2006;54:3068-70.
142. van den Borne BE, Dijkmans BA, de Rooij HH, le Cessie S, Verweij CL. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 1997;24:55-60.
143. Karres I, Kremer JP, Dietl I, Steckholzer U, Jochum M, Ertel W. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *Am J Physiol* 1998;274:R1058-64.
144. Mottonen T, Hannonen P, Leirisalo-Repo M, *et al.* Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: A randomised trial. Fin-raco trial group. *Lancet* 1999;353:1568-73.
145. O'Dell JR, Leff R, Paulsen G, *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine, methotrexate and sulfasalazine, or a combination of the three medications: Results of a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1164-70.
146. Kremer JM, Genovese MC, Cannon GW, *et al.* Concomitant leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2002;137:726-33.
147. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998;41:2196-204.
148. Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, *et al.* Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-methuil-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:927-34.
149. Donahue KE, Gartlehner G, Jonas DE, *et al.* Systematic review: Comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2008;148:124-34.
150. Aaltonen KJ, Virkki LM, Malmivaara A, Kontinen YT, Nordstrom DC, Blom M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing tnf blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7:e30275.
151. Leombruno JP, Einarson TR, Keystone EC. The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: Meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1136-45.
152. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-tnf antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: Systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006;295:2275-85.
153. Greenberg JD, Reed G, Kremer JM, *et al.* Association of methotrexate and tumour necrosis factor antagonists with risk of infectious outcomes including opportunistic infections in the corona registry. *Ann Rheum Dis* 2010;69:380-6.
154. Moulis G, Sommet A, Bene J, *et al.* Cancer risk of anti-tnf-alpha at recommended doses in adult rheumatoid arthritis: A meta-analysis with intention to treat and per protocol analyses. *PLoS One* 2012;7:e48991.
155. Baert F, Noman M, Vermeire S, *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.
156. Simon TA, Smitten AL, Franklin J, *et al.* Malignancies in the rheumatoid arthritis abatacept clinical development programme: An epidemiological assessment. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1819-26.
157. Pesce B, Soto L, Sabugo F, *et al.* Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory t cells and t helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol* 2013;171:237-42.
158. Snir A, Kessel A, Haj T, Rosner I, Slobodin G, Toubi E. Anti-il-6 receptor antibody (tocilizumab): A b cell targeting therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:697-700.
159. Richez C, Barnetche T, Khoryati L, *et al.* Tocilizumab treatment decreases circulating myeloid dendritic cells and monocytes, 2 components of the myeloid lineage. *J Rheumatol*;39:1192-7.
160. Terpos E, Fragiadaki K, Konsta M, Bratengeier C, Papatheodorou A, Sfikakis PP. Early effects of il-6 receptor inhibition on bone homeostasis: A pilot study in women with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:921-5.
161. Jones G. The ambition trial: Tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*;6:189-95.

162. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, *et al.* Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (adacta): A randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet* 2013;381:1541-50.
163. Szodoray P, Alex P, Dandapani V, *et al.* Apoptotic effect of rituximab on peripheral blood b cells in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2004;60:209-18.
164. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-cd20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2007;44:3823-37.
165. Gong Q, Ou Q, Ye S, *et al.* Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in b cell immunotherapy. *J Immunol* 2005;174:817-26.
166. Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K, *et al.* Depletion of b cells by a humanized anti-cd20 antibody pro70769 in macaca fascicularis. *J Immunother* 2005;28:212-9.
167. Grillo-Lopez AJ, White CA, Varns C, *et al.* Overview of the clinical development of rituximab: First monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 1999;26:66-73.
168. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete b lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:205-11.
169. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of b cell subsets after transient b cell depletion using anti-cd20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2377-86.
170. Roll P, Dorner T, Tony HP. Anti-cd20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: Predictors of response and b cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 2008;58:1566-75.
171. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, *et al.* Rituximab therapy reduces activated b cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: Depletion of memory b cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R131.
172. Leandro MJ, Cooper N, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Bone marrow b-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:29-36.
173. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, Bokarewa MI, Brisslert M. Short- and long-term effects of anti-cd20 treatment on b cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R123.
174. Cioc AM, Vanderwerf SM, Peterson BA, Robu VG, Forster CL, Pambuccian SE. Rituximab-induced changes in hematolymphoid tissues found at autopsy. *Am J Clin Pathol* 2008;130:604-12.
175. Rosengren S, Wei N, Kalunian KC, Zvaifler NJ, Kavanaugh A, Boyle DL. Elevated autoantibody content in rheumatoid arthritis synovia with lymphoid aggregates and the effect of rituximab. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R105.
176. Teng YK, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM. Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced b cell repopulation. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1011-6.
177. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: Mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:917-25.
178. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, *et al.* The anti-cd20 antibody rituximab reduces the th17 cell response. *Arthritis Rheum* 2011;63:1507-16.
179. Teng YK, Levarht EW, Hashemi M, *et al.* Immunohistochemical analysis as a means to predict responsiveness to rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2007;56:3909-18.
180. Hogan VE, Holweg CT, Choy DF, *et al.* Pretreatment synovial transcriptional profile is associated with early and late clinical response in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1888-94.
181. Silverman GJ, Boyle DL. Understanding the mechanistic basis in rheumatoid arthritis for clinical response to anti-cd20 therapy: The b-cell roadblock hypothesis. *Immunol Rev* 2008;223:175-85.
182. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, *et al.* Serologic changes following b lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2146-54.
183. Smekens SP, van den Hoogen MW, Kamburova EG, *et al.* The effects of in vivo b-cell depleting therapy on ex-vivo cytokine production. *Transpl Immunol*;28:183-8.
184. Lurati A, Marrazza MG, Re KA, Scarpellini M. Relationship between nk cell activation and clinical response in rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Int J Biomed Sci* 2009;5:92-5.
185. Wilk E, Witte T, Marquardt N, *et al.* Depletion of functionally active cd20+ t cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009;60:3563-71.

186. Henry C, Ramadan A, Montcuquet N, *et al.* Cd3+cd20+ cells may be an artifact of flow cytometry: Comment on the article by wilk *et al.* *Arthritis Rheum* 2010;62:2561-3; author reply 3-5.
187. Genovese MC, Kaine JL, Lowenstein MB, *et al.* Ocrelizumab, a humanized anti-cd20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase i/ii randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2652-61.
188. Keystone E, Emery P, Peterfy CG, *et al.* Rituximab inhibits structural joint damage in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* 2009;68:216-21.
189. Boumans MJ, Thurlings RM, Yeo L, *et al.* Rituximab abrogates joint destruction in rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis. *Ann Rheum Dis*;71:108-13.
190. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, *et al.* The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: Results of a phase iib randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:1390-400.
191. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with b lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2002;61:883-8.
192. Higashida J, Wun T, Schmidt S, Naguwa SM, Tuscano JM. Safety and efficacy of rituximab in patients with rheumatoid arthritis refractory to disease modifying antirheumatic drugs and anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *J Rheumatol* 2005;32:2109-15.
193. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, *et al.* Efficacy of b-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2572-81.
194. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, *et al.* Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase iii trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006;54:2793-806.
195. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, *et al.* Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: A randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (study evaluating rituximab's efficacy in mtx inadequate responders (serene)). *Ann Rheum Dis* 2010;69:1629-35.
196. Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth A, *et al.* Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: The image trial. *Ann Rheum Dis* 2011;70:39-46.
197. Keystone E, Fleischmann R, Emery P, *et al.* Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: An open-label extension analysis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3896-908.
198. Keystone EC, Cohen SB, Emery P, *et al.* Multiple courses of rituximab produce sustained clinical and radiographic efficacy and safety in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to 1 or more tumor necrosis factor inhibitors: 5-year data from the reflex study. *J Rheumatol* 2012;39:2238-46.
199. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd, *et al.* Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in ra patients. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1496-502.
200. Carson KR, Evens AM, Richey EA, *et al.* Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in hiv-negative patients: A report of 57 cases from the research on adverse drug events and reports project. *Blood* 2009;113:4834-40.
201. Clifford DB, Ances B, Costello C, *et al.* Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatoid arthritis. *Arch Neurol* 2011;68:1156-64.
202. Reddy V, Croca S, Gerona D, *et al.* Serum rituximab levels and efficiency of b cell depletion: Differences between patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:951-2.
203. Thurlings RM, Teng O, Vos K, *et al.* Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*;69:409-12.
204. Boumans M, Teng O, Thurlings R, *et al.* Progression of structural damage is not related to rituximab serum levels in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1462-6.
205. Tran L, Vogel WV, Sinaasappel M, *et al.* The pharmacokinetics of (1)(2)(4)i-rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Antibodies* 2011;20:7-14.

206. Fischer SK, Yang J, Anand B, *et al.* The assay design used for measurement of therapeutic antibody concentrations can affect pharmacokinetic parameters: Case studies. *MABs* 2012;4:623-31.
207. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the foxp3 functional marker of regulatory t cells following b cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol* 2007;123:66-73.
208. Abdulahad WH, Meijer JM, Kroese FG, *et al.* B cell reconstitution and t helper cell balance after rituximab treatment of active primary sjogren's syndrome: A double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2011;63:1116-23.
209. Pijpe J, Meijer JM, Bootsma H, *et al.* Clinical and histologic evidence of salivary gland restoration supports the efficacy of rituximab treatment in sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2009;60:3251-6.
210. Li Z, Mou W, Lu G, *et al.* Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol* 2011;93:91-8.
211. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum* 1980;23:137-45.
212. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A. Spanish version of the health assessment questionnaire: Reliability, validity and transcultural equivalency. Grupo para la adaptacion del haq a la poblacion espanola. *J Rheumatol* 1993;20:2116-22.
213. van Gestel AM, Stucki G. Evaluation of established rheumatoid arthritis. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 1999;13:629-44.
214. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, *et al.* Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous tnf antagonist has failed: Pooled data from 10 european registries. *Ann Rheum Dis*;70:1575-80.
215. Gomez-Reino JJ, Maneiro JR, Ruiz J, Rosello R, Sanmarti R, Romero AB. Comparative effectiveness of switching to alternative tumour necrosis factor (tnf) antagonists versus switching to rituximab in patients with rheumatoid arthritis who failed previous tnf antagonists: The mirar study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1861-4.
216. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC. Repeated b lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:626-30.
217. Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC. Circulating levels of b lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: Relationships with b cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 2006;54:723-32.
218. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive b cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2993-9.
219. Vancsa A, Szabo Z, Szamosi S, *et al.* Longterm effects of rituximab on b cell counts and autoantibody production in rheumatoid arthritis: Use of high-sensitivity flow cytometry for more sensitive assessment of b cell depletion. *J Rheumatol* 2013;40:565-71.
220. Lurati A, Bertani L, Marrazza M, Re KA, Bompane D, Scarpellini M. Nk cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Biologics* 2012;6:83-7.
221. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Alvaro-Gracia JM, *et al.* Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One* 2011;6:e29492.
222. Feuchtenberger M, Muller S, Roll P, *et al.* Frequency of regulatory t cells is not affected by transient b cell depletion using anti-cd20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J* 2008;2:81-8.
223. Isvy A, Meunier M, Gobeaux-Chenevier C, *et al.* Safety of rituximab in rheumatoid arthritis: A long-term prospective single-center study of gammaglobulin concentrations and infections. *Joint Bone Spine* 2012;79:365-9.
224. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, *et al.* Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after b cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol*;38:633-41.
225. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, *et al.* Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with sle. *Clin Immunol* 2007;122:62-74.
226. Abdulahad WH, Meijer JM, Kroese FG, *et al.* B cell reconstitution and t helper cell balance after rituximab treatment of active primary sjogren's syndrome: A double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*;63:1116-23.

227. Neidhart M, Fehr K, Pataki F, Michel BA. The levels of memory (cd45ra-, ro+) cd4+ and cd8+ peripheral blood t-lymphocytes correlate with igm rheumatoid factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996;15:201-9.
228. Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, *et al.* Increment of tal positive cells in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989;16:904-10.
229. Thurkow EW, van der Heijden IM, Breedveld FC, *et al.* Increased expression of il-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 1997;181:444-50.
230. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. Il-15/il-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:259-80.
231. McInnes IB, Gracie JA, Harnett M, Harnett W, Liew FY. New strategies to control inflammatory synovitis: Interleukin 15 and beyond. *Ann Rheum Dis* 2003;62 Suppl 2:ii51-4.
232. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Garcia-Vicuna R, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Laffon A. Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long- term disease. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:639-42.
233. Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, McInnes IB, Liew FY. Soluble il-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: A role for il-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998;160:5654-60.
234. Halvorsen EH, Stronen E, Hammer HB, Goll GL, Sollid LM, Molberg O. Interleukin-15 induces interleukin-17 production by synovial t cell lines from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*;73:243-9.
235. Cho ML, Ju JH, Kim KW, *et al.* Cyclosporine a inhibits il-15-induced il-17 production in cd4+ t cells via down-regulation of pi3k/akt and nf-kappab. *Immunol Lett* 2007;108:88-96.
236. Harris KM. Monocytes differentiated with gm-csf and il-15 initiate th17 and th1 responses that are contact-dependent and mediated by il-15. *J Leukoc Biol* 2011;90:727-34.
237. Amlong CA, Nardelli DT, Peterson SH, Warner TF, Callister SM, Schell RF. Anti-interleukin-15 prevents arthritis in borrelia-vaccinated and -infected mice. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:289-96.
238. Yoshihara K, Yamada H, Hori A, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y. Il-15 exacerbates collagen-induced arthritis with an enhanced cd4+ t cell response to produce il-17. *Eur J Immunol* 2007;37:2744-52.
239. Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed th17/treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012;32:2731-6.
240. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of cd8+ memory t cells by opposing cytokines. *Science* 2000;288:675-8.
241. Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, *et al.* Il-2-induced activation-induced cell death is inhibited in il-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11445-50.
242. Kokaji AI, Hockley DL, Kane KP. Il-15 transpresentation augments cd8+ t cell activation and is required for optimal recall responses by central memory cd8+ t cells. *J Immunol* 2008;180:4391-401.
243. Benito-Miguel M, Garcia-Carmona Y, Balsa A, *et al.* A dual action of rheumatoid arthritis synovial fibroblast il-15 expression on the equilibrium between cd4+cd25+ regulatory t cells and cd4+cd25- responder t cells. *J Immunol* 2009;183:8268-79.
244. Benito-Miguel M, Garcia-Carmona Y, Balsa A, *et al.* Il-15 expression on ra synovial fibroblasts promotes b cell survival. *PLoS One*;7:e40620.
245. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory t cells. *Immunity* 2008;29:848-62.
246. Musso T, Calosso L, Zucca M, *et al.* Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 1999;93:3531-9.
247. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (il)-15alpha and il-15 supports natural killer cell and memory cd8+ t cell homeostasis. *J Exp Med* 2004;200:825-34.
248. Schluns KS, Klonowski KD, Lefrancois L. Transregulation of memory cd8 t-cell proliferation by il-15alpha+ bone marrow-derived cells. *Blood* 2004;103:988-94.
249. Sandau MM, Schluns KS, Lefrancois L, Jameson SC. Cutting edge: Transpresentation of il-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of il-15 and il-15r alpha by the same cells. *J Immunol* 2004;173:6537-41.
250. Blanco P, Pitard V, Viillard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated cd8+ t lymphocytes expressing perforin and granzyme b correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:201-11.

251. Kanegane H, Tosato G. Activation of naive and memory t cells by interleukin-15. *Blood* 1996;88:230-5.
252. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in nk cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 1999;17:19-49.
253. Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP, *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in the outpatient setting: Results, complications and admission requirements in a single institution. *Br J Haematol* 2004;125:225-31.
254. Peggs KS. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1093-101.
255. Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Munz C. Nk cell survival mediated through the regulatory synapse with human dcs requires il-15 $\alpha$ . *J Clin Invest* 2007;117:3316-29.
256. Alarcon GS, Tracy IC, Strand GM, Singh K, Macaluso M. Survival and drug discontinuation analyses in a large cohort of methotrexate treated rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 1995;54:708-12.
257. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, *et al.* Idec-c2b8 (rituximab) anti-cd20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:2188-95.
258. Thurlings RM, Teng O, Vos K, *et al.* Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:409-12.
259. Tran L, Huitema AD, van Rijswijk MH, *et al.* Cd20 antigen imaging with (1)(2)(4)i-rituximab pet/ct in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Antibodies* 2011;20:29-35.