

## TESIS DOCTORAL

---

# BIOMARCADORES DE RESPUESTA A LA TERAPIA ANTI-TNF $\alpha$ EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Tesis doctoral presentada por María Isabel Acosta Colmán,  
Licenciada en Medicina y Cirugía, por la que opta al grado de Doctor en Medicina

Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. Sara Marsal Barril  
Dr. Vicent Fonollosa Pla

---

**UAB**

Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

**Sara Marsal i Barril**, Professora associada del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Facultatiu Especialista en Reumatologia de la Unitat de Reumatologia, Servei de Medicina Interna del Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

**Vicent Fonollosa i Pla**, Catedràtic de Medicina y Director del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap Clínic del Servei de Medicina Interna del Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

**CERTIFIQUEN:**

Que el treball titulat: “**Biomarcadores de respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$  en pacientes con Artritis Reumatoide**” realitzat per la llicenciada en Medicina i Cirurgia i especialista en Reumatologia **María Isabel Acosta Colmán** i codirigit per els sotasignats, reuneix tots els requisits científics y formals per a procedir a la seva lectura i defensa com a tesi per accedir al grau de Doctor en Medicina.

I perquè consti a tots els efectes oportuns, signem el present certificat a Barcelona, a 8 de Octubre de 2012.

**Sara Marsal i Barril**

**Vicent Fonollosa i Pla**

## Agradecimientos

Después de un largo camino, he llegado al final de mi objetivo. Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su paciencia, apoyo y conocimiento me han ayudado a la realización del presente proyecto de tesis doctoral.

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Sara Marsal, por su paciencia, por la orientación, la motivación y el apoyo recibido durante todos estos años y sobre todo por su valioso tiempo que a pesar de sus múltiples ocupaciones, ha seguido paso a paso con detalle este proyecto de tesis doctoral. Gracias por sus enseñanzas y ejemplo de sacrificio, que estarán presentes siempre a lo largo de mi vida profesional.

Especial reconocimiento al Dr. Antonio Julia, por el interés mostrado por mi trabajo y enseñarme conceptos que hasta hace poco eran desconocidos para mí.

Mi gratitud a todos los compañeros del *Grup de Recerca* de Reumatología del *Institut de Recerca Vall d'Hebron* en especial a Arnal Alfonso, Oriol Canela y Raúl Tortosa, ya que la presente tesis doctoral es el resultado del esfuerzo de todo un equipo.

A todos los pacientes que han participado en este estudio y en la creación del IMID Biobank. Sin su participación y su confianza en el esfuerzo dedicado a la investigación este proyecto de tesis doctoral no hubiera sido posible.

A todo el equipo humano que participo en el proyecto IMID Kit, los investigadores reumatólogos colaboradores, los residentes de reumatología y los ATS de cada centro participante. En especial a Carmen Merín y Salvador Campos que me ayudaron en la obtención de las muestras de los pacientes del *Hospital Universitari Vall d'Hebron* por su paciencia y disponibilidad constate.

A mis amigos quienes supieron comprender mis ausencias y que siempre me animaron a continuar en mis momentos más difíciles.

A mi familia, mis padres Margarita y Rodolfo, y mis hermanos, Eugenia, Cristina y Juanjo, gracias por su apoyo, por el amor y la paciencia, que a pesar de la distancia han vivido cada momento difícil y de felicidad a mi lado.

A mi esposo, Christian, por su apoyo, por las muchas noches sin dormir a mi lado, por todo su amor. Esta tesis la hemos terminado juntos, por eso también es suya.

---

# INDICE

---

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>1.- Artritis Reumatoide</b>	2
1.1.- Concepto y epidemiología de la Artritis Reumatoide	2
1.2.- Etiología y patogenia de la Artritis Reumatoide	2
1.2.1.- Factores no genéticos	2
1.2.2.- Factores genéticos	5
1.2.3.- Patogenia de la Artritis Reumatoide	10
1.3.- Diagnóstico de la Artritis Reumatoide	12
1.3.1.- Criterios de clasificación de la Artritis Reumatoide	12
1.3.2.- Autoanticuerpos en la Artritis Reumatoide	15
1.4.- Manifestaciones clínicas de la Artritis Reumatoide	17
1.5.- Morbilidad y Mortalidad en la Artritis Reumatoide	19
<b>2.- Tratamiento de la Artritis Reumatoide</b>	22
2.1.- Tratamiento sintomático	22
2.2.- Tratamiento con FAMES	23
2.3.- Tratamiento con terapias biológicas	27
2.3.1.- Terapia anti-TNF $\alpha$	27
2.3.2.- Otras terapias biológicas	35
2.4.- Valoración de la actividad inflamatoria en la Artritis Reumatoide	38
2.5.- Criterios de respuesta clínica	41
<b>3.- Biomarcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math> en la Artritis Reumatoide</b>	43
3.1.- Biomarcadores no genéticos de respuesta	43
3.1.1.- Biomarcadores epidemiológicos	43
3.1.2.- Biomarcadores clínicos	47
3.1.3.- Biomarcadores serológicos	50
3.1.4.- Biomarcadores histológicos	53
3.2.- Biomarcadores genéticos de respuesta	55
3.2.1.- Polimorfismos del gen <i>TNFA</i>	55
3.2.2.- Polimorfismos del gen <i>HLA-DRB1</i>	59

3.2.3.- Otros polimorfismos genéticos	60
<b>4.- Biomarcadores genéticos identificados mediante estudios de asociación de genoma completo</b>	<b>63</b>
4.1.- Estudios de asociación de genoma completo	63
4.2.- Estudios de asociación de genoma completo en la Artritis Reumatoide	66
4.3.- Estudios de asociación de genoma completo y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$	71
<b>OBJETIVOS</b>	<b>78</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>80</b>
<b>1.- Diseño del Estudio</b>	<b>81</b>
<b>2.- Proyecto PSE “IMID-Kit”</b>	<b>82</b>
2.1.- Definición, objetivos y estructura del Proyecto IMID-Kit	82
2.2.- IMID-Biobank	83
2.3.- Planificación del proceso de recogida de muestras biológicas y datos asociados para el Proyecto IMID-Kit	84
2.4.- Base de datos clínicos de los pacientes IMID	87
2.5.- Pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el Proyecto IMID-Kit	89
<b>3.- Sujetos del estudio</b>	<b>95</b>
<b>4.- Análisis de Biomarcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	<b>97</b>
4.1.- Análisis de los biomarcadores no genéticos de respuesta	97
4.1.1.- Descripción de las variables a estudio	97
4.1.2.- Análisis estadístico de los biomarcadores no genéticos	99
4.2.- Análisis de los biomarcadores genéticos de respuesta	100
4.2.1.- Genotipado Completo	101
4.2.2.- Control de calidad del estudio de asociación de genoma completo	106

4.2.3.- Análisis estadístico de los biomarcadores genéticos	107
4.3.- Replicación de <i>loci</i> asociados a la respuesta identificados en este estudio y publicados anteriormente	110
4.3.1.- Imputación	111
<b>RESULTADOS</b>	112
<b>1.- Análisis global de la cohorte</b>	113
<b>2.- Análisis en función del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	116
<b>3.- Análisis de los biomarcadores no genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	118
3.1.- Biomarcadores no genéticos de respuesta	118
3.1.1.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la respuesta	119
3.1.2.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la respuesta en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$	121
3.2.- Biomarcadores no genéticos de remisión	125
3.2.1.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la remisión	125
3.2.2.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la remisión en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$	128
<b>4.- Análisis de los biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento con anti-TNF<math>\alpha</math></b>	131
4.1.- Estudio de asociación de genoma completo	132
4.1.1.- Control de calidad	132
4.1.2.- GWAs en relación con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$	133
4.1.3.- Estimación del poder estadístico de replicación	141
4.1.4.- Estudio de asociación de vías génicas	143
<b>5.- Estudio de replicación de <i>loci</i> previamente asociados a la respuesta anti-TNF<math>\alpha</math></b>	146
5.1.- Estudio de replicación de <i>loci</i> candidatos del estudio publicado por Liu et al.	146
5.2.- Estudio de replicación de <i>loci</i> candidatos del estudio publicado por Plant et al.	147
5.3.- Estudio de replicación de <i>loci</i> candidatos del estudio publicado por Krintel et al.	148

5.4.-	Estudio de replicación de <i>loci</i> candidatos asociados al riesgo de desarrollar AR o involucrados con la patogenia de la AR	150
<b>DISCUSION</b>		153
<b>1.- Características de los sujetos del estudio</b>		154
1.1.-	Características globales	154
1.2.-	Características en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$	158
<b>2.- Biomarcadores no genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		159
2.1.-	Respuesta terapéutica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$	159
2.2.-	Biomarcadores epidemiológicos de respuesta	162
2.3.-	Biomarcadores clínicos de respuesta	166
2.4.-	Biomarcadores serológicos de respuesta	169
<b>3.- Biomarcadores no genéticos de remisión al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		171
3.1.-	Biomarcadores epidemiológicos de remisión	174
3.2.-	Biomarcadores clínicos de remisión	176
3.3.-	Biomarcadores serológicos de remisión	178
<b>4.- Biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		180
4.1.-	Características de los sujetos del estudio	180
4.2.-	Estudio de Asociación de Genoma Completo	181
4.2.1.-	Diseño del estudio	181
4.2.2.-	<i>Loci</i> asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$	183
4.2.3.-	Genes o familias génicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$	186
4.2.4.-	Replicación de nuevos <i>loci</i> candidatos: estudio del poder estadístico	207
4.2.5.-	Análisis de vías génicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$	207
4.3.-	Estudios de replicación de <i>loci</i> publicados asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$	210
4.3.1.	Validación de SNPs identificados en GWAS previos	210
4.3.2.	Validación de SNPs identificados en estudios de asociación de gen candidato previos	213



---

<b>CONCLUSIONES</b>	216
<b>ANEXOS</b>	220
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	234

---

# INTRODUCCION

---

## 1.- Artritis Reumatoide

### 1.1.- Concepto y epidemiología de la Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica y autoinmune, con una prevalencia del 0,5% de la población adulta en España y una incidencia de 20 a 50 casos por 100.000 habitantes por año. Predomina en el género femenino con una ratio de 3:1 y tiene un pico de incidencia máximo entre los 40 y 50 años de edad, aunque en los hombres se presenta en edades más avanzadas<sup>(1,2)</sup>.

La prevalencia de la AR puede variar según la población estudiada. Se ha descrito una prevalencia máxima del 7,1% en determinados asentamientos, como el de los indios americanos o en los esquimales<sup>(3)</sup>. Las menores tasas de prevalencia se han observado en países del Mediterráneo<sup>(4)</sup>, Europa Central<sup>(5)</sup>, Asia<sup>(6)</sup> y América del Sur<sup>(7,8)</sup>. Por ejemplo en el Sur de Asia, incluyendo Japón y China, la frecuencia se sitúa entre el 0,2% y el 0,3%<sup>(9)</sup>.

La AR es una enfermedad que se caracteriza por una poliartritis simétrica, erosiva que puede presentar manifestaciones extra-articulares. A medida que la enfermedad progresa, el daño en las articulaciones es irreversible conduciendo a la pérdida de la función y a la deformidad articular<sup>(10)</sup>. Varios estudios han demostrado que la AR produce una discapacidad importante en aproximadamente el 70% de los pacientes después de más de 10 años de evolución de la enfermedad<sup>(10,11)</sup>. Además existe un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular que reduce la esperanza de vida de los pacientes con AR entre 3 y 18 años en relación con la población general<sup>(12)</sup>.

La AR es una enfermedad compleja de etiología desconocida, donde participan factores tanto genéticos como ambientales que dan inicio a esta patología y que influyen no solo en su inicio sino también en su evolución<sup>(13)</sup>.

### 1.2.- Etiología y patogenia de la Artritis Reumatoide

#### 1.2.1.- Factores no genéticos

La AR es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes en la que determinados factores ambientales acompañados de una susceptibilidad genética específica, pueden iniciar una serie de alteraciones en el sistema inmune que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. La contribución de cualquiera de estos factores es necesaria pero no suficiente para la expresión de la enfermedad<sup>(14,15)</sup>.

Los estudios realizados en gemelos proporcionan información importante sobre el grado de influencia de los factores genéticos y ambientales en las enfermedades complejas. En la AR por ejemplo, los estudios realizados en gemelos monocigóticos (MCT) indican una concordancia de aproximadamente el 15%, sugiriendo que la contribución genética es limitada y que los factores ambientales tienen una influencia importante en el desarrollo de la enfermedad<sup>(16)</sup>.

Se define la concordancia genética como la presencia del mismo rasgo fenotípico en una pareja de gemelos MCT, o en una pareja cualquiera de individuos dentro de un grupo donde se está estudiando el rasgo en concreto. Dicho en otras palabras es el riesgo relativo que tiene un gemelo de desarrollar la enfermedad de la que fue diagnosticada su hermano gemelo. Una tasa de concordancia elevada sugiere un predominio de la influencia genética sobre el componente ambiental, mientras que una tasa de concordancia baja indica una marcada influencia de los factores ambientales<sup>(17)</sup>.

Los estudios epidemiológicos realizados en las últimas décadas han identificado numerosos factores de riesgo ambientales en el desarrollo de la AR. Se ha observado asociación con el tabaco, la exposición al sílice, las infecciones, el género femenino, el consumo de alcohol, la dieta y la periodontitis<sup>(15,18)</sup>, entre otros. A continuación analizaremos estos factores ambientales comenzando por la asociación más robusta hasta ahora, el hábito tabáquico.

Se ha observado que la AR se inicia a edades más tempranas en sujetos fumadores que en sujetos no fumadores<sup>(19,20)</sup>. Recientemente se han producido importantes avances en el conocimiento de la relación entre el tabaquismo y el desarrollo de la AR. Klareskog et al<sup>(14)</sup> introdujeron tres nuevos conceptos. Primero que la presencia del "epítoto compartido" (EC) en una molécula HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de clase II confiere susceptibilidad de desarrollar AR solo en el subgrupo de los pacientes con anticuerpos anti-péptidos citrulinados (anti-CCP) positivos. Segundo que esta restricción también se aplica sobre el más conocido de los factores ambientales de riesgo, el hábito tabáquico. Tercero, el hábito tabáquico está relacionado con la producción de proteínas citrulinadas modificadas en el pulmón, lo que podría explicar esta asociación cuando todos estos factores están presentes a la vez. Esta triple relación ha sido confirmada también en otros estudios<sup>(18,19,21)</sup>.

De acuerdo al estudio de Klareskog et al<sup>(14)</sup> el riesgo relativo (RR) de desarrollar AR en pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos, fumadores y sin el epítoto compartido es moderado (RR:1,5), mientras que el RR en pacientes fumadores con anti-CCP positivos y con una o dos copias del EC es más elevado (RR=6,5 y RR:21, respectivamente). Estos resultados han sido comparados en otras poblaciones americanas y europeas de origen caucásico<sup>(22,23,24)</sup>.

Se estima que entre el 43% y 63% de los pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos, también son positivos a anticuerpos contra el péptido  $\alpha$ -enolasa citrulinada, el cual está fuertemente asociado con el alelo HLA-DRB1\*04, con determinados polimorfismos del gen *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22*) y con el hábito tabáquico. No obstante aun no se conoce el mecanismo por el cual los anticuerpos contra una enzima glicolítica como la enolasa pueden contribuir a la inflamación articular que se observa en la AR<sup>(21)</sup>.

Varios estudios epidemiológicos han analizado la asociación entre la exposición a partículas cristalinas de sílice y el riesgo de desarrollar la AR. El sílice es uno de los componentes ambientales más robustamente asociado a la desregulación del sistema inmunitario<sup>(25)</sup>. Rocha et al<sup>(26)</sup> sugieren que la disminución de la expresión

de las proteínas CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) y de PDCD-1 (*Programmed Cell Death 1*), ambas expresadas en la superficie de los linfocitos T, pueden constituir uno de los mecanismos implicados en el aumento de la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes en los trabajadores expuestos al silice.

Otros estudios han sugerido que también la dieta puede influir en la progresión clínica de la enfermedad e inclusive en el riesgo de desarrollar AR. Se ha descrito que los pacientes con AR tienen en suero concentraciones menores de una variedad de antioxidantes, incluyendo la vitamina E, el  $\beta$  caroteno, el selenio y el zinc<sup>(27,28)</sup>. Certhan et al<sup>(28)</sup> observaron en un estudio realizado en 152 pacientes con AR que la ingesta elevada de suplementos de vitamina C, de vitamina E, de zinc y de *B-cryptoxanthin* estaba inversamente asociada con el riesgo de desarrollar la AR. En relación a una posible asociación entre la ingesta de determinados grupos de alimentos y el riesgo de desarrollar AR se ha observado que un mayor consumo de frutas y verduras crucíferas se asociaba de forma inversa con el riesgo de desarrollar AR<sup>(28)</sup>. Sin embargo ninguna de las asociaciones descritas en ambos estudios alcanzó una significación estadística en el análisis multivariante<sup>(27,28)</sup>. En otro estudio Shapiro et al<sup>(29)</sup> observaron una asociación inversa entre el consumo de frutas y el riesgo de desarrollar AR, pero no se pudo confirmar una posible asociación con la ingesta de vegetales.

En relación al consumo de café, no se ha objetivado ninguna asociación significativa tanto con el consumo de café normal, café descafeinado y te, con el riesgo de desarrollar AR<sup>(30)</sup>.

Existen pocos estudios que hayan examinado la asociación del consumo de alcohol con el riesgo de desarrollar la AR a pesar de su elevado consumo en la población general. Hasta ahora los datos disponibles sugieren que el alcohol podría tener un efecto protector. El estudio de Källberg et al<sup>(31)</sup> incluyó los datos de 1.204 pacientes con AR y 871 controles del estudio EIRA (*Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*) y 444 pacientes con AR y 533 controles del estudio CACORA (*CAse-COntrol study on Rheumatoid Arthritis*) y se analizó el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar AR. En este estudio se objetivó que existe una reducción dosis-dependiente en el riesgo de desarrollar AR en sujetos que consumen alcohol de forma regular en comparación con los no bebedores, independientemente del sexo y la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CCP. Unos resultados similares se observaron en un estudio realizado por Maxwell et al<sup>(32)</sup> donde se objetivó que el consumo de alcohol (dosis-dependiente) estaba asociado de forma inversa con el riesgo y la gravedad de la AR.

Otro factor frecuentemente descrito como desencadenante de enfermedades autoinmunes son las infecciones. Las infecciones pueden conducir a la pérdida de la tolerancia del sistema inmune por distintos mecanismos como por ejemplo el mimetismo molecular, cambios estructurales en las proteínas o la exposición a antígenos crípticos. Además, en las infecciones virales, los virus pueden estimular intracelularmente los TLR (*Toll-Like Receptors*) en células dendríticas plasmocitoides y producir interferón alfa (INF $\alpha$ ) que estimula el sistema inmune adaptativo,

uno de los primeros pasos en el desarrollo de autoinmunidad <sup>(16)</sup>.

Al respecto se han publicado algunas observaciones indirectas que relacionan determinados agentes infecciosos como el virus del Epstein Barr, el parvovirus B19, los retrovirus y algunas bacterias, pero no existen datos concluyentes que impliquen de forma directa a un agente infeccioso específico en el desarrollo de la AR en sujetos genéticamente predispuestos <sup>(33)</sup>. Se ha descrito la presencia del parvovirus B19 en células sinoviales de pacientes con AR lo que sugiere que el parvovirus B19 podría tener un papel patogénico en el inicio y el mantenimiento de la sinovitis en la AR <sup>(31)</sup>. Así también se ha observado que la infección aguda por parvovirus B19 puede simular una AR inclusive con la producción de factor reumatoide (FR) y anticuerpos anti-CCP <sup>(34)</sup>.

Finalmente, muchos estudios han investigado una posible asociación entre los factores hormonales y el riesgo de desarrollar AR. Se estima que la mayor prevalencia de la AR en las mujeres está relacionada de alguna manera con las hormonas sexuales. Los estrógenos tienen un efecto activador sobre el sistema inmune y esto podría ser un factor que explique esta diferencia entre géneros y los cambios en la actividad de la enfermedad durante el embarazo y el puerperio <sup>(35)</sup>.

### 1.2.2.- Factores genéticos

Tal y como se ha comentado previamente la AR es una enfermedad compleja en la que existe una fuerte interacción entre el genoma y el medio ambiente. La investigación de las variaciones genéticas que determinan la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad compleja está basada en varias estrategias como son el estudio de la concordancia (estudios en gemelos), el estudio de prevalencias (*lambda sibling*), el estudio de la heredabilidad y finalmente la estrategia del gen candidato.

Las poblaciones históricamente muy aisladas se prestan a otra alternativa para valorar el componente genético de la susceptibilidad a desarrollar la AR que se basa en la reconstrucción de la genealogía de sus habitantes. Identificar este tipo de poblaciones no es fácil y aun menos poder establecer su genealogía, por eso existen pocos estudios de este tipo en la AR. De entre ellos cabe destacar un estudio realizado con población islandesa, una población históricamente aislada y con un registro genealógico privilegiado. En él se demuestra que, efectivamente, los islandeses con AR están más relacionados entre sí genealógicamente que con el resto de los habitantes de la isla <sup>(41)</sup>.

Los primeros estudios dirigidos a demostrar la presencia de un componente genético en la AR fueron los clásicos estudios realizados en gemelos. Estos estudios determinan la concordancia, definida anteriormente, entre gemelos MCT y dicigóticos (DCT). Silman et al <sup>(36)</sup> reportaron una concordancia del 15,4 % en gemelos MCT y del 3,6% en gemelos DCT.

MacGregor et al<sup>(37)</sup> compararon las tasas de concordancia entre pares de gemelos femeninos y masculinos de Finlandia y Gran Bretaña. Los pacientes gemelos MCT de género masculino procedentes de Finlandia presentaron un 9,5% de concordancia para la AR, en comparación con el 2,3% en gemelos DCT. Los gemelos del género femenino tenían una concordancia del 13,5% frente al 3,8% entre los gemelos DCT. Los gemelos MCT de género masculino británicos tenían una concordancia del 7,7% frente al 0% entre los pares DCT, mientras que las mujeres del grupo de gemelos MCT tenían una concordancia del 16,7% en comparación con un 3,8% de concordancia entre gemelos DCT.

La segunda estrategia altamente informativa para el estudio de las variantes genéticas de riesgo en una enfermedad compleja es la utilización de los datos de prevalencia familiar y de la población de referencia para calcular los cocientes de riesgo.

Este método se ha convertido en una forma muy utilizada para estimar el tamaño y del efecto del componente genético en las enfermedades complejas<sup>(38)</sup>. Este método utiliza las tasas de prevalencia para calcular el riesgo relativo de la enfermedad entre dos poblaciones que se comparan, la mayoría de veces, entre hermanos de los individuos afectados y la población general. Esto proporciona un valor denominado *lambda sibling* ( $\lambda_s$ ), o riesgo relativo entre hermanos, que se calcula de la siguiente manera:

$$\lambda_s = \frac{\text{prevalencia de la enfermedad en los hermanos de los individuos afectados}}{\text{prevalencia de la enfermedad en la población general}}$$

La obtención de un valor fiable de  $\lambda_s$  depende de disponer de unas estimaciones precisas de la prevalencia de la enfermedad en los dos grupos que se comparan. El riesgo relativo entre hermanos en las enfermedades autoinmunes abarca un rango de  $\lambda_s$  entre 10 y 40 mientras que en la AR este valor se sitúa entre 3 y 10 y el riesgo relativo entre gemelos monozigóticos ( $\lambda_{MZ}$ ) entre 20 a 60<sup>(39)</sup>.

Una tercera estrategia para determinar el componente genético en las enfermedades complejas se basa en el concepto de la heredabilidad. La heredabilidad ( $h^2$ ) es la proporción de la variación fenotípica de la población que se debe a la variación genotípica entre individuos.

En la AR se acepta que el 60% de la variación responsable de la aparición de la enfermedad en la población es atribuible a factores genéticos. Este porcentaje es una estimación cuantitativa de la influencia genética conocida como heredabilidad y a diferencia de la concordancia, no está sesgada por la prevalencia de la enfermedad en la población<sup>(37,40)</sup>.

Una última estrategia ampliamente utilizada es la denominada “estrategia del gen candidato”. Esta estrategia consiste en analizar aquellos genes cuyo producto proteínico parece estar implicado en la fisiopatología de la enfermedad<sup>(40)</sup>.

Se calcula que aproximadamente un tercio de la influencia genética en la susceptibilidad a desarrollar AR está representada por determinados polimorfismos

de los genes que codifican para las moléculas HLA de clase II <sup>(42)</sup>. Stastny fue el primero en demostrar una asociación de la molécula HLA-DRw4 con la AR en la década de 1970 utilizando técnicas serológicas <sup>(43)</sup>. Este hallazgo inicial ha evolucionado de forma sustancial en los últimos años y actualmente se ha identificado de forma inequívoca la asociación de distintos alelos del gen *HLA-DRB1* y la AR.

El MHC (*Human Major Histocompatibility Complex*) que contiene entre otros los genes que codifican las moléculas HLA es, con diferencia, la región más estudiada entre las familias de genes asociadas a la AR. El MHC comprende alrededor de 4 millones de pares de bases en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y es una región esencial en el normal funcionamiento del sistema inmune <sup>(44)</sup>.

Los estudios originales serológicos y bioquímicos de las moléculas HLA identificaron la presencia de dos isotipos fundamentales: moléculas HLA de clase I y moléculas HLA de clase II. Las moléculas HLA de clase I están formadas por una cadena  $\alpha$  de 45 kD codificada dentro del MHC, que se asocia de forma no covalente con una cadena de  $\beta$ 2-microglobulina (codificada en el cromosoma 15). Las moléculas HLA de clase II están formadas por la asociación no covalente de cadenas  $\alpha$ -(32 kD) y  $\beta$ -(28 kD), que están codificadas en el MHC. Las moléculas HLA de clase I y II son glucoproteínas de superficie celular, ancladas a la membrana por segmentos transmembrana hidrofóbicos. La estructura de las moléculas de superficie de clase II en las células presentadoras de antígeno tiene una gran importancia en la susceptibilidad y la gravedad de la AR <sup>(45)</sup>.

Gregersen et al <sup>(46)</sup> observaron que un grupo de alelos que codifican una secuencia estable de aminoácidos en la tercera región hipervariable de la cadena  $\beta$  de las moléculas HLA de clase II era más prevalente en pacientes con AR que en sujetos control. Estos alelos comparten una secuencia de aminoácidos similar "glutamina-leucina-arginina-alanina" (QKRAA) en el dominio implicado en la presentación del antígeno al receptor del linfocito T. Posteriormente esta región se denominó "epítipo compartido"(EC) anteriormente citado, que es actualmente el polimorfismo genético que presenta una asociación más robusta con la susceptibilidad de desarrollar la AR <sup>(15,23,47,48,49,50)</sup>.

Se ha observado que los alelos del gen *HLA-DRB1* como el \*0401, \*0404, \*0405 y \*0408 están fuertemente asociados con la AR, mientras que otros alelos como el \*0402 o el \*0403 no han demostrado dicha asociación. Según la raza se pueden observar claras diferencias. Por ejemplo, se ha demostrado que el alelo HLA-DR6 (DRB1\*1402) está asociado a la AR en pacientes nativos de América, mientras que el alelo HLA-DRB1\*0101 y el \*1001 está asociado a la AR en pacientes precedentes de la India y en pacientes del Mediterráneo. Esta diferencia es más remarcable en España. En el sur de España fueron observadas las asociaciones con los alelos HLA-DRB1\*0101, \*1001 y con el alelo HLADR4-Dw15 (DRB1\*0405) <sup>(51)</sup>. Mientras que en Lugo, al noroeste de España, se identificó una asociación evidente con el alelo HLA DRB1\*0401 y una asociación más discreta con los alelos HLA DRB1\*0404, \*0405 y \*0101 <sup>(48,52)</sup>.



Existe controversia sobre si la presencia del EC confiere susceptibilidad a desarrollar la AR o es un marcador de agresividad de la enfermedad. MacGregor et al.<sup>(31)</sup> observaron que el EC homocigótico y el genotipo HLA-DRB1\* 0401/\*0404 está sustancialmente asociado al desarrollo de una AR temprana y más grave, en especial en los hombres<sup>(53)</sup>. La presencia del EC en la molécula HLA puede activar la producción de los anticuerpos anti-CCP. Los pacientes con AR con estos anticuerpos desarrollan en las primeras etapas de la enfermedad mayor daño erosivo en las articulaciones que aquellos que carecen de ellos<sup>(54)</sup>.

La presencia del EC también está asociada con mayor frecuencia a las manifestaciones extra-articulares, como los nódulos subcutáneos, la vasculitis y la fibrosis pulmonar. Varios estudios han demostrado la existencia de esta relación entre las manifestaciones extra-articulares y la presencia del EC<sup>(48)</sup>.

El primer *locus* fuera del MHC que se ha demostrado de forma consistente que está asociado con la AR es el gen *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22*). El gen *PTPN22* codifica la proteína tirosina fosfatasa linfoide específica que es una proteína reguladora de la actividad y el desarrollo de los linfocitos T<sup>(55)</sup>. El alelo menor (T) del SNP no sinónimo rs2476601 del gen *PTPN22* fue el primer polimorfismo asociado con la diabetes mellitus tipo 1 y posteriormente con la AR en estudios que utilizaban la estrategia de los genes candidatos<sup>(55,56)</sup>.

En un meta-análisis publicado en el año 2011 por Nong et al.<sup>(57)</sup> que incluyó 11.727 casos y 12.640 controles se observó que el alelo T del polimorfismo 1858 C/T presentaba una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de desarrollar AR. Martín et al.<sup>(58)</sup> realizaron un estudio de replicación que incluyó 2.857 pacientes de origen español. En este estudio se confirmó la asociación del SNP rs2476601 con el riesgo de desarrollar AR también en población española.

La asociación del gen *CTLA4* (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) con la autoinmunidad fue inicialmente confirmada en pacientes con diabetes tipo 1 y con tiroiditis autoinmune. Posteriormente se identificó una asociación entre un polimorfismo en este gen y la susceptibilidad de desarrollar la AR. Recientemente ha sido publicado un meta-análisis<sup>(59)</sup> en relación al polimorfismo +49A/G y CT60 del gen *CTLA-4* y su relación con la susceptibilidad de desarrollar la AR. Un total de 20 artículos fueron incluidos en el meta-análisis. Los resultados indican que los pacientes portadores del alelo G (GG/GA) del polimorfismo +49A/G tienen un riesgo aumentado en un 18% de desarrollar AR, cuando los comparamos con los pacientes homocigotos portadores del genotipo AA, pero esta asociación se observó únicamente en pacientes asiáticos y no en europeos. También se observó que el alelo A del polimorfismo CT60 del gen *CTLA-4* se asocia a un riesgo disminuido en un 14% de desarrollar AR. De forma inversa esta asociación ha sido identificada en pacientes con AR de origen europeo pero no en población de origen asiático.

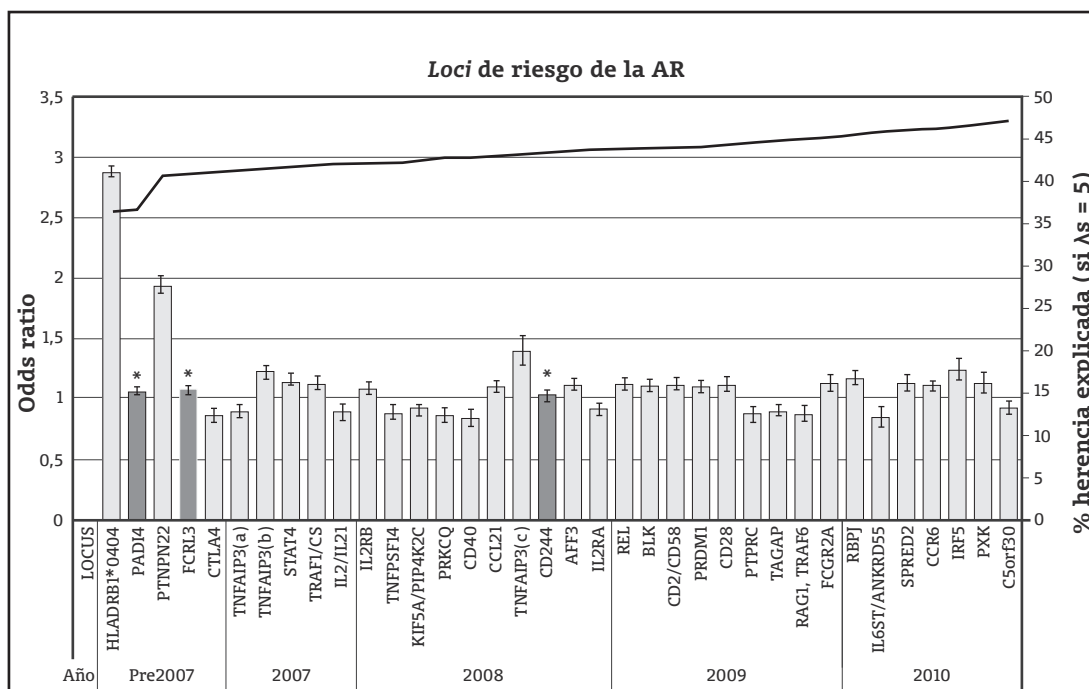
La asociación del gen *STAT4* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 4*) con la AR representa otra robusta asociación con la susceptibilidad de desarrollar AR. Este gen se encuentra en el cromosoma 2q33 y codifica un factor de transcripción que tiene un papel fundamental en la diferenciación y proliferación

tanto de las células Th1 (*T helper 1*) como de las células Th17 (*T helper 17*). Se ha demostrado que el SNP rs7574865 ubicado en el gen *STAT4* está asociado a un mayor riesgo a desarrollar la AR y otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjögren (SS) y la esclerosis sistémica (ES), incluso en estudios realizados en diferentes etnias <sup>(60,61)</sup>.

Recientemente se ha publicado un meta-análisis que incluyó 52 estudios, de los cuales 19 eran estudios en pacientes con AR y se analizó la asociación de los SNPs rs7574865 ubicado en el gen *STAT4* con el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunes sistémicas (la AR, el LES, la ES, el SS, la diabetes tipo 1, el síndrome antifosfolipídico, la artritis idiopática juvenil (AIJ) y la enfermedad inflamatoria intestinal). En este estudio se observó la existencia de una robusta asociación entre la presencia de este SNP y el desarrollo de estas enfermedades autoinmunes. Específicamente para la AR se observó un OR=1.25 <sup>(62)</sup>.

Estos polimorfismos previamente citados se han estudiado en la población general de pacientes con AR y específicamente en pacientes con AR y anticuerpos anti-CCP positivos. Sin embargo existen pocos estudios que centren su atención específicamente en los polimorfismos de riesgo en pacientes con AR y anticuerpos anti-CCP negativos. Un estudio que analiza la existencia de una posible asociación entre los genes de la familia de la lectina que codifican la proteína CLE-C16A (*C-type lectin domain family 16, member A*), ha demostrado que la variación genética en esta familia confiere susceptibilidad de desarrollar AR en pacientes con anticuerpos anti-CCP negativos <sup>(63)</sup>. Otro posible gen asociado al riesgo de desarrollar AR en pacientes con anticuerpos anti-CCP negativos es el gen *IRF5* (*Interferon Regulatory Factor 5*). Este gen induce la transcripción del interferón alfa (IFN- $\alpha$ ). Sigurdsson et al <sup>(64)</sup> examinaron la posible relación de este *locus* con la AR y observaron que cuatro SNPs en la región 50 del gen *IRF5* estaban asociados con la presencia de AR con anti-CCP negativos. Aunque esto indica un probable papel del gen *IRF5* y del IFN $\alpha$  en la patogénesis de las AR con anti-CCP negativos, estos resultados no se han podido reproducir en otras cohortes europeas <sup>(65)</sup>.

En la actualidad, se han identificado más de 30 *loci* que confieren susceptibilidad de desarrollar la AR gracias a una nueva estrategia de estudio del componente genético de las enfermedades complejas, la estrategia de los estudios de GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) que describiremos con precisión más adelante. A modo de resumen en el siguiente gráfico se presentan los *loci* de riesgo identificados para el desarrollo de la AR publicados en un estudio de revisión reciente <sup>(55)</sup>.

**Gráfico 1.** Loci de riesgo de la artritis reumatoide identificados hasta el año 2010.

\*loci en poblaciones asiáticas. Gráfico modificado del artículo de Orozco et al (2011).

### 1.2.3.- Patogenia de la Artritis Reumatoide

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica inmunomediada de etiología desconocida que afecta al tejido sinovial de las articulaciones diartrodiales. La infiltración de la membrana sinovial por células mononucleares, especialmente por las células T y los macrófagos, y la hiperplasia del revestimiento sinovial son rasgos característicos de la enfermedad. En la articulación normal, el revestimiento de la membrana sinovial es sólo de una o dos capas de células, mientras que en la AR con frecuencia es de 4 a 10 capas de profundidad. Se identifican dos tipos celulares en este revestimiento: células tipo macrófagos (tipo A) y células tipo fibroblastos (tipo B). En la sinovial normal se detecta un número similar de células A y B, mientras que en la AR estas células aumentan en tamaño y en número, existiendo un predominio de células de tipo A <sup>(45,66)</sup>.

En la AR un hallazgo histológico característico, es la presencia de un tejido de granulación localizado en la interfase entre el sinovio y el cartílago o el hueso en los sitios de destrucción articular. A este tejido se le conoce como “*pannus*”, que significa paño. Es una estructura derivada de la membrana sinovial que invade el cartílago desde la periferia de la articulación. Este proceso da lugar a la erosión del cartílago y del hueso mediada principalmente por células linfoides y osteoclastos <sup>(45,67)</sup>.

La migración celular es facilitada por la activación de células endoteliales en los microvasos del tejido sinovial, que aumenta la expresión de las moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y miembros de la superfamilia de las inmunoglo-

bulinas) y quimioquinas. La neogénesis linfoidea, la cual está inducida por la hipoxia local, por las citoquinas, y por una linfangiogénesis insuficiente, es característica de la sinovitis en la AR<sup>(50)</sup>. Tanto la extensión como el patrón de la infiltración de linfocitos sinoviales varía de forma notable entre los diferentes individuos con AR. En algunos individuos se observa una infiltración difusa o escasa de linfocitos T, mientras que en otros los linfocitos B y T están organizados en agregados linfocitos<sup>(68,69)</sup>.

Se ha descrito que los tejidos sinoviales con infiltrados difusos y los tejidos sinoviales con neogénesis linfoidea representan diferentes subtipos fisiopatológicos de la AR. Thurlings et al<sup>(69)</sup> observaron en un estudio basado en biopsias sinoviales obtenidas en la artroscopia de 103 pacientes, que la neogénesis linfoidea sinovial está asociada con una inflamación sistémica y sinovial más grave, no obstante no se puede definir un subtipo clínico o inmunológico de AR.

La producción de interleuquinas (IL) es llevada a cabo por diferentes poblaciones de células sinoviales y ocupa un lugar central en la patogénesis de la AR<sup>(70)</sup>. Las citoquinas, especialmente la IL-1, TNF $\alpha$  e IL-6, son importantes en la conducción de la respuesta de fase aguda. No obstante las citoquinas también modulan las interacciones celulares que caracterizan a la inflamación crónica<sup>(45)</sup>.

El TNF $\alpha$  es el miembro de una familia de mediadores peptídicos que incluye la linfoxina  $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), el ligando Fas (FasL), el ligando CD40 (CD40L) y el RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*). Esta citoquina tiene un papel muy importante en la activación celular y en la apoptosis<sup>(45,66)</sup>.

El TNF $\alpha$  tiene un papel fundamental a través de la activación de la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales, la protección de los fibroblastos sinoviales, la promoción de la angiogénesis, la supresión de las células T reguladoras y la inducción del dolor. La unión del TNF $\alpha$  a sus receptores inicia una cascada de diversos procesos biológicos como la activación de diferentes vías de señalización incluyendo la activación de los factores de transcripción (i.e. las proteínas kinasas (*c-Jun N-terminal kinase* (JNK) y la *p38 MAP kinase*) y proteasas (i.e. enzimas que escinden las uniones peptídicas como la caspasas)) que tienen un impacto importante en la respuesta inflamatoria<sup>(66)</sup>.

El TNF $\alpha$  puede contribuir en la patogenia de la AR por la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1y la IL-6, por el aumento de la migración de leucocitos, por el aumento de la permeabilidad endotelial y la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales y leucocitos, la activación de los neutrófilos y eosinófilos, la inducción de reactantes de fase aguda y por medio de la producción de enzimas (enzimas de matriz o metaloproteinasas) producidas por los sinoviocitos y /o condrocitos<sup>(45)</sup>.

El TNF $\alpha$ , la IL-6 y la IL1 son mediadores clave en la migración celular observada en el proceso inflamatorio de la AR<sup>(71)</sup>. El papel central de estas citoquinas sobre todo del TNF $\alpha$  y de la IL-6 se ha confirmado por el éxito terapéutico secundario al bloqueo de los receptores de membrana y de los receptores solubles del TNF $\alpha$  y

de la IL-6 en pacientes con AR<sup>(50,72)</sup>.

La IL-6 conduce a la activación local de leucocitos y la producción de anticuerpos. Así también la IL-6 interviene en los efectos sistémicos que promueven la producción de los reactantes de fase aguda, la anemia, la disfunción cognitiva y la desregulación del metabolismo de los lípidos<sup>(45)</sup>.

La IL-1, es otra citoquina importante en la AR, que promueve la activación de leucocitos, células endoteliales, condrocitos y osteoclastos Sin embargo el beneficio clínico posterior a la inhibición de esta interleucina es reducido.

La IL-17, también tiene un papel fundamental en la patogénesis de la AR. Comparte varias propiedades con la IL-1 y el TNF $\alpha$  (i.e. la degradación del cartílago) y presenta una acción sinérgica con estas citoquinas. Las concentraciones de IL-17 y la proporción de células Th17 en el espacio articular y en la circulación periférica están elevadas en pacientes con AR. Otras citoquinas como la IL-23 y la IL-12 también han demostrado estar involucradas en la patogénesis de la AR<sup>(66,67,70)</sup>.

### 1.3.- Diagnóstico de la Artritis Reumatoide

#### 1.3.1.- Criterios de clasificación de la Artritis Reumatoide

El diagnóstico de la AR es a menudo un desafío, debido a un amplio espectro de formas de presentación, cambios progresivos en el curso de la enfermedad y quizás lo más importante, la falta de una prueba concreta para definir la presencia o ausencia de enfermedad<sup>(73)</sup>.

Se han realizado varios intentos de establecer criterios de clasificación de la AR, sin embargo, ha habido limitaciones significativas en la aplicación de estos criterios en el ámbito clínico. Por ejemplo los criterios de clasificación propuestos por el ACR (*American College of Rheumatology*) en 1987 (Cuadro 1) tienen una elevada sensibilidad (94%) y especificidad (89%) para diagnosticar casos de AR en fases avanzadas, con la presencia de daño articular establecido, pero tienen una escasa capacidad para identificar a los pacientes con AR temprana. Su utilización en la práctica clínica puede retrasar el diagnóstico y el inicio del tratamiento<sup>(73,74,75)</sup>.

**Cuadro 1.** Criterios de clasificación de la artritis reumatoide del *American College of Rheumatology* (1987).

<b>Rigidez matutina</b>	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora
<b>Artritis de 3 o más grupos articulares</b>	Al menos 3 grupos articulares deben estar inflamados simultáneamente y ser objetivados por un médico. Los 14 grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas
<b>Artritis de articulaciones de las manos</b>	Al menos una articulación de las manos debe estar inflamada (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales)
<b>Artritis simétrica</b>	Afectación simultánea del mismo grupo articular (definido en el criterio 2) en ambos lados del cuerpo
<b>Nódulos reumatoides</b>	Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxta-articulares observados por un médico
<b>Factor reumatoide en suero</b>	Presencia de valores elevados de factor reumatoide por cualquier método con un resultado en controles inferior al 5%
<b>Alteraciones radiológicas</b>	Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en articulaciones afectadas

Debido a estas limitaciones se han elaborado unos nuevos criterios con la finalidad de establecer unos parámetros de clasificación que faciliten la detección de pacientes en estadios precoces de la enfermedad. En el año 2010, un grupo de expertos en el marco de la ACR y el EULAR (*The European League Against Rheumatism*) se reunieron para desarrollar unos nuevos criterios de clasificación de la AR (Cuadro 2) <sup>(76,77)</sup>.

Estos criterios no incluyen la presencia de nódulos reumatoides o erosiones detectadas por radiografía simple, los cuales son poco probable que se detecten en las etapas tempranas de la AR. Así mismo la artritis simétrica tampoco está incluida en estos nuevos criterios que no excluyen aquellas formas que se inician de forma asimétrica <sup>(76)</sup>.

Para la definición de estos nuevos criterios se utilizaron datos de 3.115 pacientes procedentes de 9 cohortes de AR de reciente comienzo. Desde julio del año 2007 hasta noviembre del 2008 un grupo de trabajo de expertos de la ACR y del EULAR llevó a cabo una primera fase que tenía el objetivo de identificar aquellas variables más relevantes y establecer la influencia de cada una de ellas en la decisión del

médico de iniciar el fármaco modificador de la enfermedad (FAME)<sup>(78)</sup>. En una segunda fase en mayo del 2009 se realizó otra reunión de expertos durante 2 días (12 miembros representativos del EULAR y 12 miembros representativos del ACR) que analizaron casos de pacientes con artritis indiferenciada precoz de la práctica diaria, con el objetivo de estudiar las distintas variables clínicas y de laboratorio como posibles predictores de desarrollar la AR. En una tercera fase, todo el grupo de trabajo analizó los hallazgos de las dos fases previas, perfeccionó el sistema y determinó el punto de corte óptimo para la AR definida. Finalmente se validaron los criterios en tres cohortes independientes no utilizadas para el desarrollo de los propios criterios<sup>(76)</sup>.

**Cuadro 2.** Criterios de clasificación de la artritis reumatoide del *The European League Against Rheumatism* (2010).

<b>Afectación articular</b>	
1 articulación grande afectada	00
2-10 articulaciones grandes afectadas	01
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	02
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	03
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	05
<b>Serología</b>	
FR y ACPA negativos	00
FR y/o ACPA positivos bajo (< 3 VN)	01
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	02
<b>Reactantes de fase aguda</b>	
VSG y PCR normales	01
VSG y/o PCR elevadas	02
<b>Duración</b>	
<6 semanas	00
≥6 semanas	01

Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6. **FR:** factor reumatoide, **ACPA:** anticuerpos anti-péptido citrulinado, **VSG:** velocidad de eritrosedimentación globular, **PCR:** proteína C reactiva.

Este esquema de clasificación está diseñado para identificar el subgrupo de pacientes que presentan una inflamación articular inexplicada, para quienes el riesgo de persistencia de los síntomas o daño estructural es suficiente para que sea

considerada la indicación del tratamiento con FAMES<sup>(76)</sup>.

A diferencia de los criterios antiguos, estos nuevos criterios tienen en cuenta la presencia de anticuerpos anti-CCP ya que se ha demostrado que predicen una mayor actividad de la enfermedad y un riesgo aumentado de progresión del daño radiológico, por lo que podrían identificar un subgrupo de pacientes con una AR más agresiva y erosiva, y por tanto más susceptibles de beneficiarse de una terapia precoz e intensa<sup>(73)</sup>.

### 1.3.2.- Autoanticuerpos en la Artritis Reumatoide

Las enfermedades autoinmunes como la AR a menudo se caracterizan por la presencia de auto-anticuerpos. El factor reumatoide (FR) es el "clásico" auto-anticuerpo de la AR. Este auto-anticuerpo fue descrito por primera vez hace más de 60 años y desde entonces ha sido ampliamente utilizado para el diagnóstico de esta patología con un valor pronóstico reconocido.

El FR es un autoanticuerpo dirigido contra determinantes antigénicos sobre el fragmento cristizable (Fc) de las moléculas de inmunoglobulinas G (IgG)<sup>(45)</sup> y es producido localmente en la AR por las células B presentes en los centros germinales de los folículos linfoides presentes en la membrana sinovial inflamada<sup>(79)</sup>.

En la práctica clínica la detección del FR IgM tiene una relativa baja sensibilidad (50-80%) y especificidad (70-80%) ya que puede estar presente en pacientes con otras enfermedades como la hepatitis C y en personas sanas de mayor edad. No obstante la combinación de la detección de isotipos adicionales, en particular del FR IgA, puede mejorar el diagnóstico y el valor pronóstico de estos marcadores. Varios estudios han demostrado que la detección de ambos isotipos IgM e IgA, del FR están asociados con una enfermedad más grave y de peor pronóstico<sup>(80,81)</sup>.

En los últimos años ha adquirido cada vez más importancia los tipos de anticuerpos dirigidos contra los péptidos citrulinados. En 1993, Simón et al<sup>(82)</sup> identificaron a la filagrina como el antígeno diana específico en la AR de los anticuerpos que se conocen como AKAs (*Anti-Keratin Antibodies*). Posteriormente, se demostró que los APFs (*Anti-Perinuclear Factors*) y los anticuerpos anti-Sa tienen a la citrulina contenida en péptidos o en proteínas como un antígeno común<sup>(79)</sup>.

Los anticuerpos específicos para las proteínas citrulinadas, que son casi exclusivamente detectados en los sueros de pacientes con AR, reconocen una variedad de antígenos citrulinados, incluyendo la  $\alpha$ -enolasa, el fibrinógeno, el colágeno tipo II, la vimentina y la filagrina por lo que se identifican colectivamente como ACPA (*Anti-Citrullinated Protein Antibodies*). Curiosamente, se han detectado altas concentraciones de ACPA en el tejido sinovial inflamado y en el líquido sinovial de las articulaciones de los pacientes con AR, lo que sugiere su posible papel en la inflamación sinovial<sup>(83)</sup>.



El ensayo de ELISA más frecuentemente utilizado para la detección de ACPA se basa en la detección de péptidos cíclicos citrulinados (CCP). Los anticuerpos anti-CCP han demostrado ser tan sensibles (77%) como el FR, y altamente específicos (96%) para la AR y más específico que el FR en la enfermedad temprana. Sobre la base de varios datos que confirman su papel predictivo y pronóstico, los anti-CCP se han incluido entre los nuevos criterios de clasificación de la AR del 2010<sup>(83,84)</sup>.

La presencia de anticuerpos anti-CCP está asociado con un patrón más grave y más erosivo de la AR. Cada día existen más evidencias en relación a que la presencia de los anticuerpos anti-CCP determina un subconjunto específico de pacientes con AR. Tal y como se ha descrito anteriormente existe una asociación específica entre el epítotope compartido codificado por determinados alelos del gen *HLA-DRB1* y los anticuerpos anti-CCP<sup>(85,86)</sup>. Sin embargo esto debe analizarse considerando el grupo étnico de los pacientes, porque la susceptibilidad a desarrollar la AR y la gravedad de la enfermedad secundaria a la presencia del EC puede modificarse por la presencia de otros alelos que están influenciados por la etnicidad. Esta observación se discutió claramente en un estudio que incluyó pacientes con AR de origen asiático, en donde la presencia del EC no estuvo asociada con la presencia de anticuerpos anti-CCP<sup>(87)</sup>.

Como se ha comentado anteriormente Klareskog et al<sup>(14)</sup> incluyeron pacientes europeos de la cohorte EIRA y observaron que el hábito tabáquico se relacionaba con la producción de anticuerpos anti-CCP pero solo en pacientes con el EC. Sin embargo en un estudio que incluyó tres cohortes de pacientes de origen americano no se observó una robusta interacción entre el EC, los anticuerpos anti-CCP y el hábito tabáquico<sup>(88)</sup>.

Los hallazgos histológicos también varían entre pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos y negativos. Histológicamente, los pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos tienen más linfocitos en el tejido sinovial en relación a aquellos pacientes con anticuerpos anti-CCP negativos que presentan más fibrosis y engrosamiento de la membrana sinovial<sup>(89)</sup>.

Al igual que el FR, los anticuerpos anti-CCP pueden preceder a la manifestación de la enfermedad durante varios años y su presencia se relaciona con la gravedad. También se pueden detectar los anticuerpos anti-CCP en el 56% de los casos de reumatismo palindrómico y al igual que el FR, en estos pacientes constituyen un factor pronóstico de evolución hacia la AR definida<sup>(86,90,91)</sup>.

Además de los anticuerpos FR y de los anti-CCP, se han descrito diversos autoanticuerpos, unos más específicos que otros relacionados con la AR. Los ANA (*AntiNuclear Antibodies*) se han descrito en un 10 a 28 % de los pacientes con AR con Síndrome de Sjögren asociado o en los pacientes con AR de edad avanzada. Aunque no se consideran marcadores específicos de la enfermedad, los anticuerpos anti-Ro/SSA se determinaron en pacientes con AR con una frecuencia del 6%<sup>(92)</sup>. En diferentes estudios se ha descrito que la presencia de los anticuerpos anti-Ro/SSA en los pacientes con AR, predispone a la presencia de manifestaciones extra-articulares con más frecuencia como por ejemplo el

síndrome seco, la vasculitis cutánea, la leucopenia, las neuropatías periféricas y los nódulos reumatoides<sup>(92,93)</sup>.

#### 1.4.- Manifestaciones clínicas de la Artritis Reumatoide

La característica clínica principal de la AR es la inflamación crónica de la membrana sinovial de las articulaciones periféricas siendo las más comúnmente afectadas las metacarpofalángicas (MCP), interfalángicas proximales (PIP), metatarsfalángicas (MTP) y los carpos. También pueden verse afectas otras articulaciones de mayor tamaño como los hombros, codos, rodillas y caderas. La inflamación poliarticular persistente es con frecuencia simétrica y causa tumefacción y dolor articular importante, acompañadas de rigidez matutina. En consecuencia se produce un gran deterioro en la calidad de vida de los pacientes, ya que con frecuencia los pacientes con AR presentan algún grado de daño articular irreversible, deformidad y discapacidad funcional para realizar las tareas básicas de la vida diaria<sup>(45,94)</sup>.

El inicio de la AR puede ser agudo, gradual o insidioso. La presentación gradual ocurre en al menos el 50% de los pacientes. La tumefacción de las articulaciones debido a la sinovitis puede ser claramente visible, o puede existir un sutil engrosamiento sinovial que puede ser solo identificado en la exploración física por reumatólogos expertos. Con frecuencia los pacientes también pueden presentar artralgiyas antes de que la tumefacción de las articulaciones sea aparente. Los síntomas en las grandes articulaciones generalmente, se presentan después de que se hayan visto afectadas las articulaciones más pequeñas. Es probable que la sinovitis de las articulaciones grandes se mantenga asintomática durante más tiempo que en las pequeñas<sup>(45,66)</sup>.

La afectación de la columna vertebral en la AR está limitada a la región cervical. La lesión más importante se observa en la articulación atlanto-axial donde se puede observar una subluxación que puede cursar de forma asintomática o que puede ocasionar manifestaciones clínicas que incluyen cefalea, cervicalgia o parestesias, entre otras<sup>(66)</sup>.

La AR puede también afectar estructuras no articulares como los tejidos musculares, tendones, ligamentos y fascias<sup>(95)</sup>.

La rigidez matutina que dura más de una hora sugiere una etiología inflamatoria. Los síntomas sistémicos inespecíficos son poco frecuentes pero la fatiga, la pérdida de peso, y la fiebre pueden constatarse en formas muy activas de la enfermedad<sup>(96)</sup>.

Las manifestaciones sistémicas extra-articulares se presentan entre un 18 y 41% de los pacientes con AR<sup>(95,97)</sup>. Las manifestaciones extra-articulares han sido clasificadas en graves y no graves según los criterios de Malmö, tal y como se presenta en la tabla1<sup>(97,98)</sup>.

**Tabla 1.** Manifestaciones extra-articulares de la Artritis Reumatoide según la clasificación de Malmö y las comorbilidades más frecuentemente asociadas a la Artritis Reumatoide.

Organo o tejido afectado	Manifestaciones extra-articulares no graves	Manifestaciones extra-articulares graves	Comorbilidades
<b>Piel</b>	Nódulos, Fenómeno de Raynaud	Petequias, púrpura, úlceras, gangrenas	Cáncer
<b>Pulmón</b>	Bronquiectasias obliterantes Neumonía organizada	Pleuritis, enfermedad pulmonar intersticial	Carcinoma de pulmón
<b>Corazón</b>	Valvulopatía Miocarditis Arritmias	Pericarditis Vasculitis coronaria Aortitis	Hipertensión Insuficiencia cardiaca Cardiopatía isquémica
<b>Sistema nervioso periférico y central (SNC)</b>	-	Mono-polineuritis múltiple Vasculitis del SNC	Síndrome depresivo Mielopatía cervical *
<b>Afectación ocular</b>	Ojo seco	Episcleritis o escleritis Vasculitis de la retina	-
<b>Afectación hematológica</b>	-	Síndrome de Felty	Linfoma no Hodgkin Linfadenopatía Esplenomegalia
<b>Riñón</b>	-	Glomerulonefritis Nefritis intersticial Amiloidosis	-
<b>Hueso</b>	-	-	Osteoporosis

\*Secundaria a la subluxación atlanto-axial

Los nódulos reumatoides son una de las manifestaciones extra-articulares más frecuente y se presentan aproximadamente entre un 20 y 40 % de los pacientes. Estos se localizan con preferencia en las zonas peri-articulares y las expuestas a presiones mecánicas como el olécranon, el tendón de Aquiles y el occipucio. También pueden presentarse en diferentes órganos como el pulmón. Son más frecuentes en pacientes con FR positivo y se presentan con más frecuencia en pacientes tratados con metotrexato (MTX). Se ha observado que los pacientes con nódulos tienen una mayor probabilidad de presentar vasculitis reumatoide<sup>(99)</sup>. La vasculitis reumatoide clínicamente detectable ocurre en el 1-4% de los pacientes con AR. En algunos pacientes pueden presentarse formas graves de vasculitis necrotizante<sup>(100)</sup>.

La afectación ocular se observa con frecuencia en la AR y puede afectar a todas las capas de los ojos. Entre el 11 al 31% de los pacientes con AR tienen manifestaciones oculares que incluyen la queratoconjuntivitis seca, la escleritis, la episcleritis, la queratitis, las úlceras corneales, la vasculitis retiniana... etc<sup>(101)</sup>. La queratoconjuntivitis seca es la más frecuente y puede estar presente en casi el

90 % de los pacientes con AR moderada a grave<sup>(102)</sup>.

Los pacientes pueden presentar pericarditis, miocarditis o afectación cardiaca valvular. La pericarditis es la manifestación cardiaca más frecuente pero solo entre el 1 y el 4 % son clínicamente manifiestas. No obstante se ha descrito una incidencia en autopsias del 50%<sup>(95,97)</sup>. Otras complicaciones cardiacas como la endocarditis, la arteritis de las coronarias y la aortis pueden ocurrir pero en muy raras ocasiones<sup>(97)</sup>.

La afectación pulmonar es una manifestación relativamente poco frecuente y puede afectar entre el 5 y el 10% de los pacientes con AR<sup>(97)</sup>. Puede presentarse de distintas formas que incluyen sobre todo la enfermedad pulmonar intersticial, la enfermedad de las vías aéreas pequeñas, los nódulos reumatoides, el derrame pleural y las vasculitis pulmonares<sup>(103)</sup>. La enfermedad pleural es la afectación más común, pero por lo general es asintomática. Un estudio que incluyó autopsias de pacientes con AR observó la afectación pleural en el 50% de los casos de AR, de los cuales sólo el 10% ha sido detectado clínicamente<sup>(104)</sup>.

La afectación renal en la AR es rara. No obstante se ha descrito una glomerulonefritis membranosa y un síndrome nefrítico debido a la amiloidosis secundaria a la AR. La enfermedad renal intersticial en la AR ocurre en raras ocasiones en ausencia de vasculitis<sup>(95)</sup>.

En relación a la afectación neurológica, la AR rara vez es causa de paquimeningitis y neuritis óptica, no obstante siempre debe ser considerada a la hora de establecer el diagnóstico diferencial. En los casos de meningitis reumatoide se ha objetivado una infiltración linfocítica en las meninges, necesaria para establecer el diagnóstico<sup>(105,106)</sup>

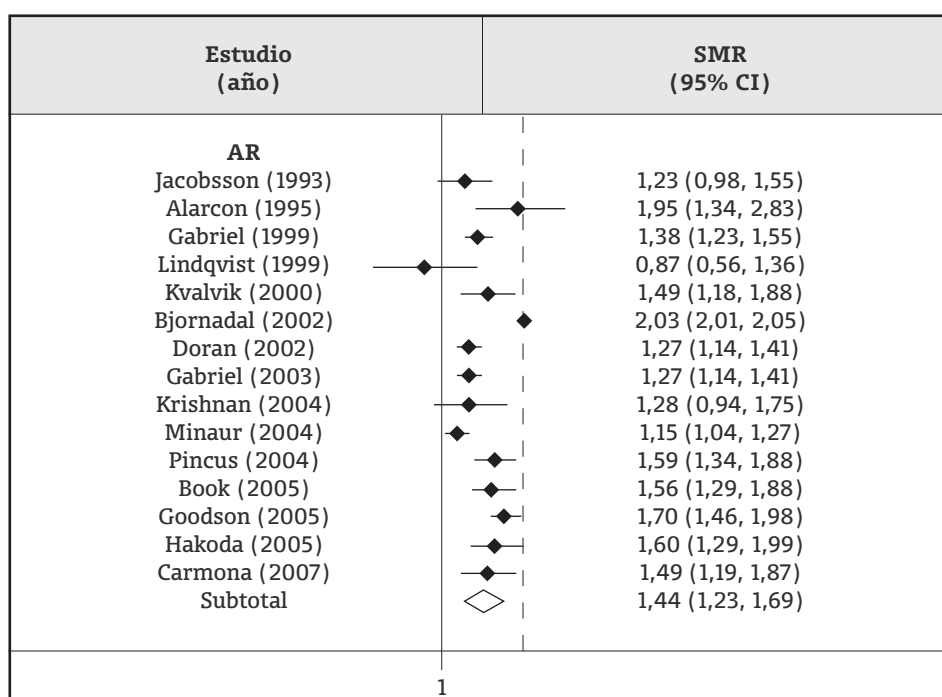
## 1.5.- Morbilidad y Mortalidad en la Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide está asociada a un elevado riesgo de morbilidad y muerte prematura<sup>(54)</sup>. Numerosos estudios de forma contundente han demostrado un incremento de la mortalidad en pacientes con AR comparada con la población general. En estos estudios se sugiere que más de una tercera parte de las muertes prematuras en la AR son debidas a un incremento de la enfermedad arteriovascular incluyendo la enfermedad isquémica cardiaca y los accidentes cerebrovasculares<sup>(107,108)</sup>.

Recientemente se ha publicado un meta-análisis<sup>(109)</sup> que evalúa la mortalidad en las enfermedades autoinmunes. Este meta-análisis incluyó 29 artículos que habían calculado el SMR (*Standardized Mortality Ratio*) en el grupo de estudio. El SMR es calculado como el ratio de muertes observadas en la cohorte estudiada en relación a la observada en una muestra del mismo tamaño procedente de la población general. En relación a la AR, fueron incluidos 15 estudios y se observó un SMR resultado del meta-análisis de 1,44 (IC95% 1,23-1,69). En el gráfico 2 se observan los estudios en pacientes con AR incluidos en este meta-análisis con sus respectivos SMR.

Las condiciones co-mórbidas son comunes en pacientes con AR y son indicadores de peor pronóstico. Aquellas AR que tienen 1 o más comorbilidades de promedio, tienen una mayor incapacidad que los pacientes sin comorbilidades<sup>(107)</sup>. Algunas comorbilidades están causalmente asociadas con la AR ya que sus prevalencias aumentan en relación a la población general y el impacto de éstas en la AR es particularmente importante. La enfermedad cardiovascular es un claro ejemplo de esta asociación. Aviña-Zubieta et al<sup>(108)</sup> en un meta-análisis de 24 estudios observaron que la mortalidad cardiovascular está aumentada en aproximadamente un 50 % en pacientes con AR en comparación con la población general.

**Gráfico 2.** Estudios incluidos en el meta-análisis publicado en el año 2012 por Toledano et al sobre la mortalidad en la Artritis Reumatoide.



Existe controversia acerca de si el incremento de la morbilidad y mortalidad es debida a una elevada prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales o es debida a la persistencia de la inflamación propia de la AR. En un meta-análisis se observó que entre los pacientes con AR existía más prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 y fumadores con respecto a la población en general<sup>(110)</sup>. No obstante está cada vez más aceptado que la inflamación persistente es un factor de riesgo independiente<sup>(111)</sup>.

También cabe la posibilidad de que los tratamientos utilizados para la AR puedan aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular asociada<sup>(107)</sup>. La prescripción de fármacos en especial los glucocorticoesteroides puede causar afectación cardiovascular inclusive a bajas dosis, tal y como se ha observado en el estudio de Ruysen-Witrand et al<sup>(112)</sup>.

Las comorbilidades de origen gastrointestinal como las hemorragias digestivas y las hepatitis tóxicas en pacientes con AR a menudo se asocian con el tratamiento farmacológico, incluyendo los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) y determinados fármacos modificadores de la enfermedad <sup>(107,113)</sup>.

La osteoporosis es frecuente en pacientes con AR y es de origen multifactorial. El riesgo para la fractura osteoporótica entre los pacientes del género femenino con AR fue de 9,6 por cada 1.000 personas-año, 1,5 veces más elevado que en las pacientes sin AR <sup>(114)</sup>. La inflamación persistente desencadena un mecanismo de activación del osteoclasto e inhibición del osteoblasto inducido por determinadas citoquinas dando lugar a una mayor reabsorción ósea. Entre otras causas de la reducción de la densidad mineral ósea se encuentran el tratamiento con glucocorticoesteroides y la inactividad de estos pacientes secundaria a la discapacidad funcional que origina la propia enfermedad <sup>(107,114)</sup>.

En los últimos años ha crecido considerablemente el interés en la relación entre la periodontitis y la AR. Esta afectación comparte con la AR factores de riesgo comunes, como el tabaquismo y la asociación con el alelo HLA-DRB1\*04. La periodontitis, que implica un daño inflamatorio de la inserción periodontal y el hueso alveolar, es más común en la AR que en controles sanos. Por otro lado existen también evidencias de que la periodontitis u otras infecciones orales pueden estar incluso involucradas en la patogénesis de la AR <sup>(115,116)</sup>.

## 2.- Tratamiento de la Artritis Reumatoide

El tratamiento de la Artritis Reumatoide ha experimentado avances muy importantes durante la última década<sup>(117,118)</sup>. Esto se debe en gran medida a dos circunstancias principales: el desarrollo de un nuevo tipo de tratamiento, los denominados tratamientos biológicos y el de una estrategia terapéutica más ambiciosa, que utiliza los distintos tratamientos de forma más eficiente para conseguir la remisión de la enfermedad.

En el año 2011 se publicó la Guía de Práctica Clínica Española (AR-GUIPCAR) como iniciativa de la Sociedad Española de Reumatología (SER) cuyo objetivo fue definir por consenso unas recomendaciones para mejorar el manejo de la AR<sup>(119)</sup>. En esta guía se establece como primera recomendación que cuanto antes se comience el tratamiento en la AR, existe una mayor probabilidad de controlar el proceso inflamatorio y reducir el daño estructural. En consecuencia, la “artritis de reciente comienzo” debe ser considerada como una prioridad diagnóstica.

Se recomienda además que el objetivo del tratamiento de la AR debe ser la remisión completa de la enfermedad y en casos de pacientes con una AR de larga evolución, conseguir la más baja actividad de la enfermedad que sea posible.

La precocidad en el inicio del tratamiento se asocia de forma contundente con una mayor probabilidad de obtener una respuesta clínica favorable. La AR-GUIPCAR por lo tanto recomienda que todos los pacientes con AR sean tratados con un FAME tan pronto como se realice el diagnóstico clínico de la enfermedad, independientemente del cumplimiento de los criterios de clasificación del ACR.

### 2.1.- Tratamiento sintomático

#### Glucocorticoesteroides

En 1948, Philip Showalter Hench, un reumatólogo de la *Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, U.S.*, administró por primera vez glucocorticoesteroides (GC) a un paciente con AR. Desde entonces se han suscitado grandes controversias en relación a la utilización de estos fármacos<sup>(120,121)</sup>.

En la AR, la prednisona generalmente puede indicarse a dosis de entre 10 y 20 mg/día en las etapas más agudas y a dosis de 5 mg/día como dosis de mantenimiento hasta conseguir el control clínico de la enfermedad con los tratamientos específicos<sup>(121)</sup>.

Algunos estudios recientes objetivan que los GC reducen la progresión del daño articular cuando se asocian a la terapia con FAMES. Estos hallazgos sugieren que los GC tendrían propiedades modificadoras de la enfermedad<sup>(122,123)</sup>.

La AR-GUIPCAR recomienda la utilización de GC en la AR de reciente comienzo por vía oral a dosis bajas como terapia modificadora de la enfermedad. En la AR

evolucionada, sin embargo, recomienda la utilización de GC a dosis bajas como terapia anti-inflamatoria controladora de los síntomas, en espera de que los FAMES surtan su efecto. También recomienda la asociación de vitamina D y calcio y la evaluación de otros tratamientos preventivos de la osteoporosis en las situaciones en las que se prevea un tratamiento con GC superior a los 3 meses<sup>(119)</sup>.

### **Anti-inflamatorios no esteroideos**

En 1961, el Dr. Adams, presentó una patente para el compuesto 2-4-isobutilfenil propiónico, que más tarde se convertiría en uno de los anti-inflamatorios no esteroideos más exitosos, el ibuprofeno<sup>(124)</sup>.

Los AINE son fármacos con una estructura química heterogénea que comparten actividad antipirética, anti-inflamatoria y analgésica a través de su capacidad para inhibir la producción de prostaglandinas proinflamatorias.

No hay una evidencia robusta que sugiera que los AINE puedan modificar el curso de la AR, por lo que son considerados tratamientos puramente sintomáticos<sup>(125)</sup>.

En la AR-GUICAR se recomienda el uso de estos fármacos en la AR de forma conjunta con los FAMES. Una vez que los FAMES actúen, se deberá reducir la dosis de los AINES hasta retirarlos si la evolución de la enfermedad lo permite<sup>(119)</sup>.

Su relativa seguridad ha atraído considerable interés, sobre todo en los últimos años donde diversos estudios han demostrado una relación entre el uso de AINE y la presencia de efectos adversos cardiovasculares<sup>(126)</sup>.

## **2.2.- Tratamiento con FAMES**

### **Metotrexato**

La AR-GUICAR recomienda que el tratamiento inicial en todos los pacientes con AR sea el metotrexato (MTX) por su excelente perfil de eficacia y seguridad<sup>(119)</sup>.

El MTX fue desarrollado por primera vez en la década de los años 40 como un antagonista específico del ácido fólico. Este fármaco inhibe la proliferación celular, principalmente mediante la inhibición *de novo* de la síntesis de las purinas y pirimidinas. Debido a sus propiedades antiproliferativas inhibe la proliferación e induce la apoptosis de los linfocitos. Así también inhibe la acumulación de leucocitos y la lesión endotelial en la zona inflamada que es mediada por neutrófilos. Otro mecanismo de acción que sustenta su actividad como anti-inflamatorio es que actúa sobre la secreción de citoquinas y sobre la liberación de adenosina que tiene a su vez un papel importante en la cascada inflamatoria<sup>(127,128)</sup>.

Para la utilización óptima del MTX se recomienda realizar una escalada rápida de la dosis hasta alcanzar los 20 o 25 mg/semanales a los 3 o 4 meses de iniciado el



tratamiento<sup>(119)</sup>. Visser et al<sup>(129)</sup> recomiendan iniciar las dosis por vía oral y en caso de refractariedad utilizar la vía subcutánea para su administración. Se recomienda además la administración de ácido fólico de 5 a 10 mg/semana ya que puede reducir alguno de los efectos adversos del MTX<sup>(128,129)</sup>.

La principal limitación para la utilización de este fármaco es la hepatotoxicidad. Se pueden observar elevaciones variables de las enzimas hepáticas con el uso de MTX, pero solo unos pocos pacientes llegan a desarrollar una enfermedad hepática clínicamente significativa<sup>(127)</sup>. Se ha descrito que los efectos adversos que ocurren inmediatamente después de la administración del MTX como el disconfort abdominal, alopecia, úlceras orales y citopenias son secundarias al déficit de folato resultado de la inhibición de la reductasa del ácido dihidrofólico<sup>(130)</sup>.

En comparaciones indirectas de estudios randomizados, el MTX en relación a otros FAMES, ha demostrado ser más eficaz que la azatioprina y que las sales de oro<sup>(131)</sup>. En otro estudio que comparaba el MTX con la leflunomida (LFN) se observó que la eficacia de estos fármacos era similar, tanto en relación a la disminución de la progresión del daño óseo como en la mejoría de la sintomatología clínica a los dos años de seguimiento<sup>(132)</sup>.

En relación a la terapia combinada se ha realizado una revisión sistemática que incluyó 20 estudios, de los cuales 8 estudios eran con MTX combinado con otros FAMES. En este estudio se observó que la combinación del MTX con la azatioprina, la salazopirina o las sales de oro, no demostró un mayor beneficio en comparación con el MTX en monoterapia. Sin embargo en este mismo estudio se observó que la combinación del MTX con la ciclosporina demostró mayor eficacia que el tratamiento con MTX en monoterapia<sup>(133)</sup>.

Ma et al<sup>(134)</sup> realizaron un estudio de revisión sistemática en relación a las terapias combinadas en la AR de reciente comienzo (<3 años). Incluyeron 15 importantes estudios sobre el tratamiento con MTX en monoterapia, la terapia combinada con FAMES y el MTX combinado con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$  y concluyeron que el MTX combinado con FAMES o con un anti-TNF $\alpha$  era más eficaz que el MTX en monoterapia. La terapia combinada con FAMES y del MTX con un anti-TNF $\alpha$  fueron igual de eficaz es en relación a la respuesta ACR, la mejoría de los valores del HAQ, la disminución de la retirada del fármaco por ineficacia y la disminución del daño radiológico. No obstante estos resultados no pueden extrapolarse a AR establecidas.

## Leflunomida

El panel de expertos de la AR-GUIPCAR recomienda que en caso de respuesta insatisfactoria o toxicidad relevante al MTX, se debe utilizar la leflunomida (LFN), la salazopirina (SSZ) o un agente anti-TNF $\alpha$  como segundo escalón terapéutico<sup>(119)</sup>.

La LFN es un derivado del isoxazol que es un inhibidor no citotóxico de la proliferación estimulada por linfocitos T y linfocitos B. Es un potente inhibidor de la síntesis de las pirimidinas por medio de la inhibición de la enzima dihidroorotato

deshidrogenasa (DHODH) <sup>(135)</sup>.

Inicialmente fue aprobado por la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento de la AR en 1999 y para el tratamiento de la artritis psoriásica en el año 2004. Se utiliza por vía oral a dosis de 20 mg/día.

En los trabajos publicados en los últimos 10 años la LFN tiene una tasa de retirada algo mayor que el MTX debido a los eventos adversos como el malestar gastrointestinal, las úlceras orales, la pérdida de peso, la hipertensión, la cefalea, la hepatotoxicidad, la pérdida del cabello, la predisposición a las infecciones y la neuropatía periférica <sup>(123,136,137)</sup>.

El tratamiento con LFN tiene una eficacia similar al tratamiento con MTX tanto en reducción de sintomatología como en la disminución del daño radiológico <sup>(135,136,138)</sup>. De Stefano et al <sup>(139)</sup> publicaron un estudio diseñado para comparar la eficacia de la LFN y del MTX en combinación con la terapia anti-TNF $\alpha$ . En este estudio se reclutaron 120 pacientes y se asoció un anti-TNF $\alpha$  al grupo de pacientes tratados con LFN y al grupo de pacientes tratados con MTX. En este estudio no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento en relación a la respuesta ACR alcanzada y a la variación del índice DAS28 (*Disease Activity Score*).

## Sulfasalazina

Tal y como se ha comentado en relación a la LFN, la AR-GUIPCAR recomienda que en las AR de inicio sin marcadores de mal pronóstico (presencia de erosiones radiológicas, FR y anticuerpos anti-CCP, ausencia de enfermedad extra-articular, HAQ superior a 1 o elevada actividad inflamatoria) es aceptable la utilización inicial de otros FAMES con un perfil de menor toxicidad o con una monitorización de efectos secundarios más sencilla como es el caso de la sulfasalazina (SSZ) <sup>(119)</sup>.

La SSZ es un pro-fármaco que consiste en una sulfapiridina que se une al ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) por un enlace azo. En 1977, Azadkhan et al <sup>(140)</sup> estudiaron la actividad terapéutica de los componentes de la SSZ y concluyeron que el 5-ASA era la fracción terapéutica activa del fármaco.

Los mecanismos precisos de acción de la SSZ siguen siendo poco conocidos. Determinados estudios han demostrado que el 5-ASA inhibe la ciclooxigenasa y la producción de prostaglandina E2. Además, se ha descrito que inhibe tanto la proteína 5-lipoxigenasa y la 5-lipoxigenasa-activante, por tanto, bloquea también la producción de leucotrienos y la quimiotaxis <sup>(140)</sup>.

La SSZ se administra para el tratamiento de AR por vía oral a dosis entre 2 a 3 gr/día.

Entre sus efectos secundarios más frecuentes están los efectos sobre el sistema nervioso central (vértigo y cefalea) y sobre el aparato digestivo (náuseas, dolor ab-

dominal, vómitos y anorexia). La mayoría de los efectos secundarios se presentan en los primeros meses de tratamiento y su incidencia desciende con la utilización continuada <sup>(119,140)</sup>.

En dos ensayos clínicos, controlados y aleatorizados en pacientes con AR de reciente comienzo tratados con FAMES, se observó que el tratamiento con MTX y el tratamiento con SSZ tenían una eficacia clínica similar. Sin embargo se observó en ambos estudios que las dosis utilizadas de MTX eran relativamente bajas (inferior a 15 mg/semana) <sup>(141,142)</sup>. En otro estudio observacional de 5 años de duración también se objetivó una respuesta clínica similar entre el tratamiento con MTX y el tratamiento con SSZ, pero la progresión radiológica fue claramente inferior en el grupo de pacientes tratados con MTX <sup>(143)</sup>.

### Hidroxicloroquina

La AR-GUIPCAR propone la utilización de los fármacos antipalúdicos como alternativa terapéutica inicial para pacientes con AR no erosiva y con menos de 6 articulaciones afectadas <sup>(119)</sup>.

El eficacia de los medicamentos antipalúdicos como la hidroxicloroquina (HCQ) y la cloroquina (CQ) se evaluó por primera vez hace más de 50 años para el tratamiento de enfermedades como la AR y el lupus eritematoso sistémico <sup>(144,145)</sup>.

El principal mecanismo de acción de la HCQ es inhibir la endocitosis mediada por receptor que afecta a muchas funciones celulares incluyendo la presentación de antígenos, la señalización del TLR (*Toll-Like Receptor*) y la modificación post-transcripcional de citoquinas <sup>(146)</sup>. Este grupo de fármacos además de sus propiedades anti-inflamatorias tienen una propiedad cardioprotectora y antitrombogénica debido a sus propiedades lisosomatópicas y los efectos inhibitorios de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias <sup>(147)</sup>.

El efecto secundario más grave es la afectación ocular que consiste en una retinopatía pigmentaria, lo que constituye una contraindicación a la continuación de la terapia. Se recomienda una dosis de HCQ <6,5 mg/kg/día para evitar la retinopatía. La cloroquina a dosis de 250 mg/día es más oculotóxica que la HCQ a 400 mg/día. La toxicidad ocular se documentó solo en un 0,65% durante los primeros 7 años de exposición, lo que confiere un bajo riesgo, pero éste se incrementa en cinco veces después de los 7 años de tratamiento o los 1.000 gramos de dosis total acumulada <sup>(146)</sup>.

Se utiliza principalmente en combinación con otros fármacos como el MTX para controlar la inflamación articular. Tiene un inicio de acción lento (2 a 6 meses) y se ha demostrado que mejora el estado funcional del paciente a largo plazo aunque no está documentado si influye en el retraso del daño radiológico <sup>(148)</sup>.

## Sales de oro

Las sales de oro ocupan un lugar importante en la historia de la reumatología y constituyen uno de los primeros fármacos utilizados ampliamente para tratar la AR. Estos agentes, que incluyen el aurotiomalato de sodio, aurotioglucosa y auranofina consisten en un átomo de oro unido a una molécula que contiene azufre <sup>(149)</sup>.

Aunque la eficacia clínica de las sales de oro está bien establecida, su mecanismo de acción en la AR sigue siendo poco conocido. No obstante las sales de oro actúan en la supresión de la producción de IL-1, la modulación de la diferenciación de los monocitos, la inhibición de la prostaglandina E2 y la producción de óxido nítrico. También se les ha atribuido la inhibición de la proteína C, la activación de la vía NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y la inducción de la hemooxigenasa <sup>(149,150)</sup>.

Los efectos secundarios clínicamente más relevantes son la toxicidad hematológica y renal. Ambas son más frecuentes en la administración intramuscular y requieren un cuidadoso seguimiento clínico y la retirada inmediata del tratamiento para evitar secuelas irreversibles. Los efectos secundarios más frecuentes son: dermatitis, estomatitis, hematuria transitoria y proteinuria moderada. De forma excepcional y en determinados casos con un tratamiento prolongado se produce una pigmentación permanente de la piel en áreas fotoexpuestas, denominada cri-siasis <sup>(151,152)</sup>.

En los ensayos clínicos, se ha observado que las sales de oro pueden reducir los signos y síntomas de la AR y la progresión radiográfica y en algunos casos, pueden inducir a la remisión sostenida. La toxicidad es la principal limitación de estos fármacos, y su uso ha disminuido con la introducción del MTX y los agentes biológicos. La utilización de las sales de oro, sin embargo, estableció un paradigma importante para la terapia de la AR y puso de manifiesto que los FAMES pueden mejorar la sinovitis y evitar la progresión radiográfica <sup>(149,150)</sup>.

## 2.3.- Tratamiento con terapias biológicas

### 2.3.1.- Terapia anti-TNF $\alpha$

Aproximadamente un tercio de los pacientes con AR no responden al tratamiento convencional con FAMES, por lo que deben recibir alguna terapia biológica. El mecanismo de acción de este tipo de fármacos se basa en un mejor conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, por lo al ser más específicos, son más eficaces y actualmente se considera que menos tóxicos que los FAMES tradicionales.

En 1997, se introdujeron nuevos tratamientos para la AR, que específicamente bloquean al TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) <sup>(153,154)</sup>. Durante la última década, la terapia con fármacos con acción anti-TNF $\alpha$  se ha convertido en la alternativa terapéutica más utilizada por los reumatólogos de EEUU y Europa para el tratamiento de la AR. Actualmente, existen cinco agentes anti-TNF $\alpha$  aprobados por la

Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la FDA (*Food and Drug Administration*), que se distinguen principalmente por su estructura, dosis y vías de administración <sup>(155)</sup>: Infliximab (IFX), Etanercept (ETA), Adalimumab (ADA), Golimumab (GLM) y Certolizumab (CZP).

Los fármacos anti-TNF $\alpha$  son claramente eficaces para el tratamiento de los pacientes con AR activa moderada o grave. Su eficacia es aún más notoria cuando se trata de una enfermedad refractaria al MTX <sup>(156)</sup>.

Recientemente fueron publicados los resultados del estudio CORRONA (*CONsortium of Rheumatology Researchers Of North America*) <sup>(155)</sup> donde se incluyeron 2.242 pacientes con AR en tratamiento con IFX, ETA y ADA. En este estudio no se observaron diferencias significativas en las tasas de respuesta entre los diferentes fármacos incluso en la remisión. En este mismo estudio sin embargo se observó que entre los tres anti-TNF $\alpha$ , el IFX se asoció con una mayor supervivencia del tratamiento.

### Estructura de las terapias anti-TNF $\alpha$

La estructura del infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab y certolizumab están representadas de forma esquemática en la figura 1. Todos los agentes, excepto el etanercept son anticuerpos monoclonales (mAbs) o fragmentos de los mismos. Los mAbs naturales se derivan de las células B que mediante la clonación expresan copias de una única cadena pesada (H) y una única cadena ligera (L) que se unen covalentemente para formar una molécula de anticuerpo de especificidad única. El mAb de ingeniería puede ser estructuralmente idéntico al mAb natural pero se desarrolla a partir de la mutación del gen imitando los procedimientos naturales <sup>(157)</sup>.

El Infliximab (Remicade ®) es un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1, de aproximadamente 149 kDa que se compone de una región humana constante (75%) y una variable murina (25%). El infliximab (IFX) se une específicamente al TNF $\alpha$  humano con alta afinidad y neutraliza la actividad biológica de esta citoquina al inhibir la unión a sus receptores <sup>(158)</sup>.

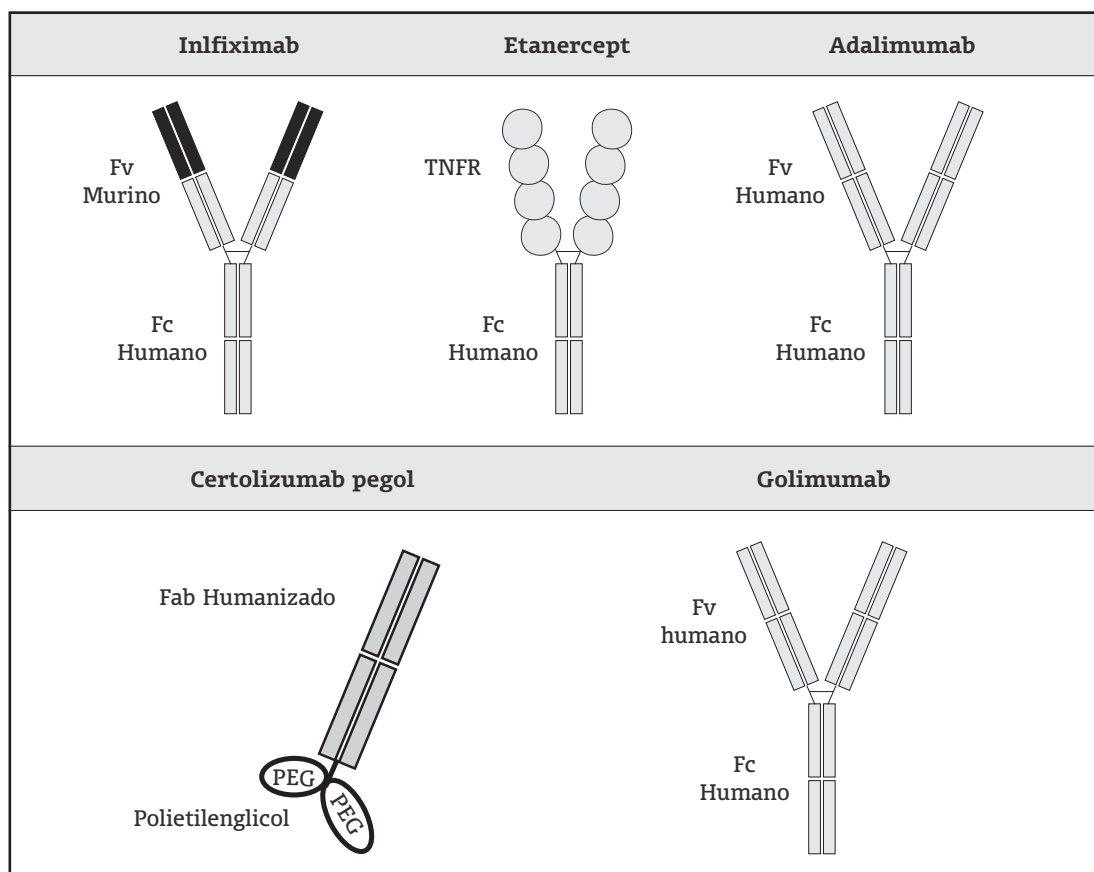
El Etanercept (Enbrel ®) es una proteína dimérica de fusión de aproximadamente 150 kDa, que bloquea la parte extracelular de los receptores p75 del TNF vinculada a la porción Fc de la IgG1 humana. El etanercept (ETA) bloquea no solo la acción del TNF $\alpha$  sino que también la acción de la linfoxina o TNF $\beta$  mediante su interacción con el receptor del TNF en la superficie celular <sup>(158)</sup>.

El Adalimumab (Humira ®) es un anticuerpo recombinante monoclonal completamente humano de aproximadamente 148 kDa <sup>(159)</sup> que actúa inhibiendo el TNF $\alpha$  humano. Al igual que el IFX, el adalimumab (ADA) no neutraliza el TNF $\beta$  <sup>(159)</sup>.

El Golimumab (Simponi ®) es un nuevo anticuerpo monoclonal humano con acción anti-TNF $\alpha$ . Se asemeja al ADA ya que es un anticuerpo monoclonal completamente

humano. Sin embargo, el golimumab (GLM) también se asemeja al IFX por las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas<sup>(157,158)</sup>.

**Figura 1:** Diagrama simplificado de la estructura de los 5 tratamientos anti-TNF $\alpha$



Fc: fracción constante de IgG, Fv: fracción variable, TNFR: dominio extracelular del receptor del TNF p75. Figura adaptada del artículo de Tracey et al<sup>(157)</sup>

El Certulizumab (Cimzia<sup>®</sup>) es un fragmento fab (*Fragment Antigen-Binding*) recombinante humanizado que está conjugado con moléculas de polietilenglicol (PEG), y actúa con especificidad para el TNF $\alpha$ . El PEG es una molécula voluminosa hidrofílica inerte que aumenta la vida media del fármaco en el plasma y facilita su penetración en el tejido sinovial inflamado. La estructura química del certolizumab (CZP) es claramente diferente a la de los otros anticuerpos monoclonales. Carece de fragmento Fc y por tanto no activa el complemento reduciendo la lisis celular dependiente de esta vía<sup>(157,12)</sup>.

## Infliximab

En el año 2000, el IFX fue aprobado por la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento de pacientes con AR activa que hayan tenido una respuesta inadecuada a FAMES incluyendo el MTX. También está indicado para el trata-

miento de la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la psoriasis. En pediatría está indicado para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa <sup>(160)</sup>.

Se administra por vía intravenosa a dosis que varían de acuerdo con la enfermedad y la respuesta clínica. En la AR se utiliza en asociación con MTX, generalmente a una dosis de 3 mg/kg en las semanas 0, 2, 6 y posteriormente cada 8 semanas <sup>(160)</sup>.

En relación a la eficacia del IFX en la prevención del daño articular el estudio ATTRACT (*Anti-TNF Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy*), ha demostrado que el IFX a dosis de 3 mg/kg combinado con MTX inhibe tanto las erosiones como el estrechamiento del espacio articular en forma más eficiente que el MTX en monoterapia <sup>(161)</sup>. Estos datos coinciden con los resultados del estudio ASPIRE (*the Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset*) que indican que la combinación de IFX y MTX reduce la progresión del daño estructural, especialmente en la etapa temprana de la enfermedad <sup>(162)</sup>.

La eficacia de IFX en los diferentes ensayos clínicos se ha estudiado en un meta-análisis que incluyó 2.129 pacientes procedentes de 6 estudios clínicos randomizados. Se evaluó la respuesta ACR entre las 14 y las 30 semanas de tratamiento con IFX combinado con MTX, en comparación con el placebo en combinación con el MTX. En el grupo tratado con IFX en relación al grupo control, el riesgo relativo (RR) de alcanzar la respuesta ACR20 fue de 1,87 (59% de los pacientes tratados con IFX vs 31 % de los pacientes en el grupo control). La respuesta ACR50 se observó con un RR de 2.68 (33% de los pacientes tratados con IFX vs 12% de los pacientes en el grupo control) y el RR de alcanzar la respuesta ACR70 fue de 2.68 (17% de los pacientes tratados con IFX vs 5 % de los pacientes del grupo control) <sup>(163)</sup>.

## Etanercept

En el año 2000, el ETA fue aprobado por la EMA para el tratamiento en adultos con AR moderada a grave en combinación con MTX en quienes presentaron una respuesta inadecuada al tratamiento con otros FAMES. El ETA puede utilizarse en pacientes con AR grave que no hayan utilizado MTX previamente. También está indicado para el tratamiento de la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante y la psoriasis; y en niños, para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil <sup>(164)</sup>.

Se administra por vía subcutánea y se absorbe lentamente desde el lugar de la inyección. La dosis utilizada es de 25 mg/dos veces por semana o 50 mg/semana <sup>(164)</sup>.

El ETA puede administrarse en monoterapia. Sin embargo el MTX se emplea con frecuencia de forma concomitante para mejorar la eficacia del tratamiento y mantener la respuesta clínica a la inhibición del TNF $\alpha$ .

En el estudio de Weinblatt et al<sup>(165)</sup> se observó que la tasa de respuesta ACR20 fue del 71% para los pacientes que recibieron ETA a dosis de 25 mg dos veces por semana asociado a MTX, comparado con el 27% de los pacientes que recibieron el placebo más MTX después de 24 semanas de tratamiento.

El ETA fue el primer tratamiento biológico comparado directamente con el MTX en la AR de reciente comienzo. En el estudio ERA<sup>(166)</sup> (*early RA*) se incluyeron 632 pacientes con AR de reciente comienzo y se comparó la eficacia del tratamiento con ETA vs MTX en monoterapia. A los 12 meses del estudio se observó que ambos grupos de tratamiento alcanzaban de forma similar la respuesta ACR20. También se valoró la progresión del daño radiográfico en ambos grupos de tratamiento. A los 12 meses se observó que la progresión del daño radiográfico disminuyó en ambos grupos de forma similar, mientras que a los 2 años, se observó que en el grupo tratado con ETA había disminuido de forma significativa en comparación con el grupo tratado con MTX, sugiriendo una clara ventaja del tratamiento con ETA respecto al tratamiento con MTX.

En el estudio TEMPO<sup>(167)</sup> (*Trial of Etanercept and Methotrexate with radiographic Patients Outcomes*) se evaluó la eficacia del ETA en monoterapia y de la combinación del ETA con el MTX en 689 pacientes con AR y observaron que a los 12 y 24 meses los pacientes tratados con ETA en combinación con el MTX, presentaban una mejoría significativa de la reducción de la actividad de la enfermedad, una mejoría en la calidad de vida y una reducción de la progresión del daño radiológico con respecto a los pacientes tratados con ETA o con MTX en monoterapia.

## Adalimumab

El ADA fue aprobado por la EMA en el año 2003 para el tratamiento en adultos de la AR moderada a grave que no hayan respondido adecuadamente a otros FAMES. Puede utilizarse en pacientes con AR grave que no hayan utilizado MTX previamente. También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, la artritis psoriasica, la enfermedad de Crohn, la psoriasis y en los niños para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil<sup>(168)</sup>.

La dosis recomendada de ADA es de 40 mg cada dos semanas por vía subcutánea.

El estudio PREMIER<sup>(169)</sup> (*A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment*) concluye que los pacientes con AR en fases tempranas (i.e. duración de la enfermedad menor a tres años) que fueron tratados durante seis meses con un tratamiento combinado de ADA y MTX, experimentaron una progresión radiográfica significativamente menor que los pacientes tratados con MTX en monoterapia.

En el estudio ARMADA<sup>(170)</sup> (*Long Term Efficacy and Safety of Adalimumab plus Methotrexate in patients with Rheumatoid Arthritis*) se utilizó ADA en monoterapia y



combinado con MTX y se comparó con un grupo de pacientes que recibía placebo asociado al MTX. En relación a la eficacia tanto en la terapia combinada como en la monoterapia el ADA se asoció con mejorías significativas en cuanto a las respuestas ACR20, ACR50 y ACR70 con respecto al grupo placebo combinado con MTX. También se observó una reducción de la progresión radiológica del daño estructural de una manera significativa.

En el estudio STAR<sup>(171)</sup> (*The Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis*) se evaluó la eficacia del ADA en combinación con otros FAMES tradicionales diferentes al MTX. Comparando con el grupo placebo, la adición de ADA al tratamiento de la AR consiguió una mayor respuesta ACR 20, ACR 50 y ACR 70 en la semana 24 de tratamiento. El estudio STAR fue el primer estudio realizado para evaluar la eficacia de un anti-TNF $\alpha$  con otros FAMES tradicionales diferentes al MTX.

### **Golimumab**

El GLM fue aprobado por la EMA en el año 2009 para el tratamiento de la AR moderada y grave en combinación con el MTX en pacientes que no hayan respondido adecuadamente a otros FAMES. También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante y la artritis psoriasica<sup>(172)</sup>.

Se administra en forma de inyección subcutánea a dosis de 50 mg cada cuatro semanas<sup>(172)</sup>.

La eficacia del tratamiento con GLM en pacientes con AR se ha investigado principalmente en tres ensayos clínicos, con diferentes poblaciones de pacientes. En el estudio Go-Forward (Golimumab FOR subjects With Active RA Despite MTX) se incluyeron pacientes con una respuesta inadecuada al MTX. En este estudio se observó que los pacientes tratados con GLM y MTX alcanzaban una mejor respuesta en comparación con los pacientes que recibían MTX en monoterapia, aunque no se objetivó una mayor eficacia cuando se comparó con el grupo de pacientes que recibían GML en monoterapia<sup>(173)</sup>.

En el estudio Go-Before (*Golimumab for subjects With Active RA Despite MTX*) se utilizó el fármaco como primera línea (i.e. pacientes que no han recibido previamente otra terapia anti-TNF $\alpha$ ) en combinación con el MTX y se observó que los pacientes que recibían GLM en combinación con el MTX alcanzaban una mayor eficacia en comparación con el grupo que recibía MTX en monoterapia<sup>(174)</sup>.

En el estudio Go-After (*Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis After treatment with tumour necrosis factor  $\alpha$  inhibitors*), se observó que el GLM puede ser eficaz en pacientes que hayan sido tratados con algún otro fármaco con acción anti-TNF $\alpha$  y que hayan presentado una respuesta inadecuada<sup>(175)</sup>.

## Certolizumab

En el año 2009 la EMA aprueba el CZP en combinación con MTX, para el tratamiento de pacientes adultos con AR activa de moderada a grave cuya respuesta a FAMES incluyendo el MTX, ha sido inadecuada. Puede ser administrado en monoterapia en caso de intolerancia a MTX o si el tratamiento continuado con MTX resulta inapropiado<sup>(176)</sup>.

La dosis de CZP es de 400 mg (2 inyecciones de 200 mg cada una en un día) en las semanas 0, 2 y 4, seguido de una dosis de mantenimiento de 200 mg (1 inyección) cada 2 semanas<sup>(176)</sup>.

La evidencia que apoya el uso de CZP en el tratamiento de AR deriva de tres ensayos pivotaes realizados en pacientes con AR activa (moderada o grave). Dos de estos estudios, el RAPID1 (*RA Prevention of structural Damage 1*)<sup>(177)</sup> y el RAPID2 (*Rheumatoid Arthritis Prevention of structural Damage 2*)<sup>(178)</sup> evalúan pacientes que habían tenido una respuesta incompleta al tratamiento con MTX los 6 meses previos al estudio. En ambos estudios se observaron mejorías significativas tanto en la respuesta clínica como en la reducción de la progresión radiográfica a la semana 24 en el grupo tratado con CZP en combinación con MTX vs el grupo que recibió placebo en combinación con MTX. Los investigadores concluyeron que el CZP en combinación con el MTX es una estrategia más eficaz que el MTX en monoterapia.

El tercer estudio fue el FAST4WARD (*eFficAcy and Safety of cerTolizumab pegol – 4 Weekly dosAge in RheumatoiD arthritis*) cuyo objetivo fue investigar la eficacia de CZP en monoterapia. En este estudio se observó que los pacientes que recibían CZP alcanzaban con más frecuencia la respuesta ACR20, ACR50 en comparación con el grupo placebo a las 24 semanas de tratamiento<sup>(179)</sup>.

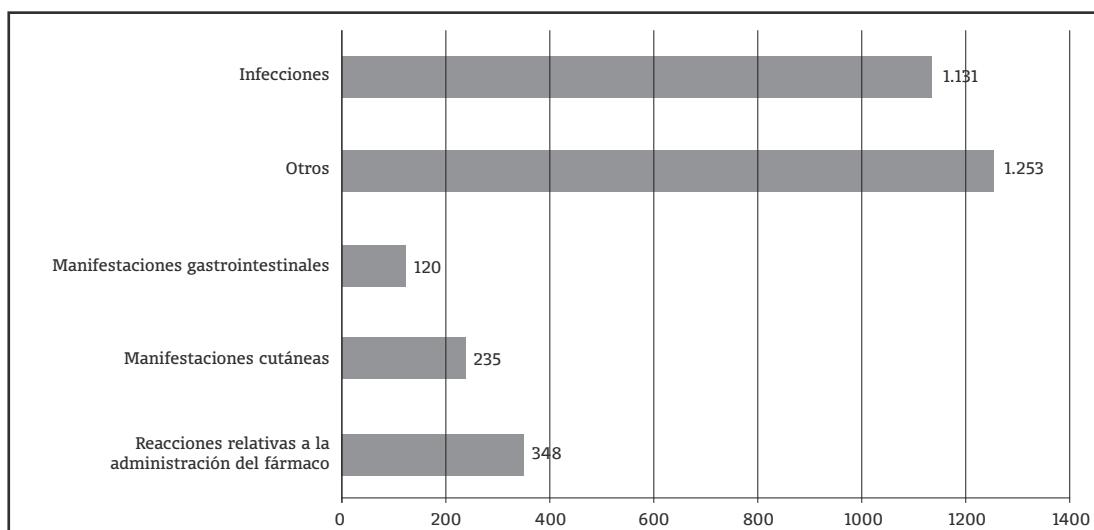
## Seguridad de las terapias anti-TNF $\alpha$

El estudio de la seguridad a largo plazo de las terapias biológicas ha sido posible gracias a la creación de distintos registros nacionales. Estos han permitido resolver varias de las dudas iniciales sobre la seguridad derivadas de los ensayos clínicos, los estudios observacionales y meta-análisis. Existe actualmente una amplia experiencia con el uso con IFX, ETA y ADA en el tratamiento de la AR, pero se necesita un mayor seguimiento y evidencia para el tratamiento con el GLM y CZP<sup>(180,181)</sup>.

En el año 2000, la Sociedad Española de Reumatología (SER) tuvo la iniciativa de crear BIOBADASER, el registro español de acontecimientos adversos de terapias biológicas en enfermedades reumáticas<sup>(182)</sup>. Actualmente este registro está compuesto principalmente por mujeres de mediana edad y con un valor de la media del tiempo de la evolución de la enfermedad de 9 años al inicio de la terapia biológica. El diagnóstico más frecuente en este registro es la AR, con 3.371 pacientes (52%), seguido de la espondilitis anquilosante (16%) y la artritis psoriásica (16%).

Carmona et al publicaron<sup>(183)</sup> los eventos adversos más frecuentes registrados en BIOBADASER en 2.854 pacientes con AR tratados con fármacos anti-TNF $\alpha$ , incluidos en el registro entre el año 2000 y el año 2009. En este estudio se observó que las infecciones son los eventos adversos más comunmente referidos seguidos de las reacciones infusionales o reacciones en el sitio de la inyección. En el gráfico siguiente se observan las frecuencias de los eventos adversos registrados en este estudio.

**Gráfico 3:** Eventos adversos con el tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con Artritis Reumatoide registrados en BIOBADASER (2000-2009)



En este contexto, Pérez-Sola et al (184) publicaron un estudio referente a las infecciones y el tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . En 6.969 pacientes del registro BIOBADASER, se observaron 907 episodios de infecciones con una incidencia de 53,09 casos/1.000 pacientes - año. La infección más frecuente fue la de origen cutáneo (12,18 casos/1000 pacientes-año), seguida por la cistitis (3,92 casos /1.000 pacientes - año), la tuberculosis (3,51 casos/1.000 pacientes - año) y la artritis séptica (3,76 casos/1.000 pacientes - año). Entre las infecciones bacterianas, los patógenos identificados con mayor frecuencia fueron: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.* En relación a los virus, el virus de la Varicela zoster y del Herpes simple fueron los más frecuentes. La candidiasis mucocutánea fue la infección más frecuentemente diagnosticada entre las infecciones fúngicas.

En relación a la reactivación del virus de la hepatitis C, el riesgo es bajo aunque se recomienda monitorizar la carga viral y las trasminasas. Sin embargo el riesgo de reactivación del virus de la hepatitis B en pacientes estables tras el uso de anti-TNF $\alpha$  es claramente superior. En estos pacientes se recomienda el uso concomitante de antivirales como la lamivudina<sup>(181,185)</sup>.

Se han comunicado infecciones por gérmenes oportunistas, incluidos hongos e infecciones bacterianas no habituales<sup>(186)</sup>. En BIOBADASER se ha observado también un aumento del riesgo de otras infecciones como la listeriosis<sup>(187)</sup>. Pero sin duda la

infección donde la disponibilidad de un registro como el BIOBADASER ha sido fundamental es la tuberculosis (TBC).

El TNF $\alpha$  juega un papel importante en la defensa del huésped contra el bacilo de Koch especialmente en la formación y la persistencia de los granulomas. Por tanto, no sorprende que hayan sido reportados casos de infección de TBC entre los pacientes tratados con bloqueantes del TNF $\alpha$  <sup>(188, 189)</sup>. El riesgo relativo de desarrollar TBC es entre 11 y 20 veces mayor en los pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$  que en los pacientes con AR que no reciben este tipo de tratamiento. Este riesgo sobre todo es mayor en pacientes tratados con IFX y ADA y claramente inferior en los pacientes tratados con ETA <sup>(190, 191, 192)</sup>.

En relación a las neoplasias, BIOBADASER presenta un análisis del seguimiento de 4.694 pacientes con una mediana de exposición de 3,1 años, que identificó 81 nuevos cánceres, con una incidencia similar entre los tres fármacos anti-TNF $\alpha$  más utilizados (IR 5,8/1000 por año, en AR) y una tendencia a disminuir después de los 4 primeros meses. Se observó un RR ajustado de 0,48 (IC del 95%, 0,09-2,45) en pacientes expuestos a anti-TNF $\alpha$  frente a los no expuestos y una tasa de incidencia estandarizada con respecto a la población general de un 34% inferior a la esperada <sup>(185, 193)</sup>. En otros registros como el registro sueco ARTIS (*Swedish Biologics Register*) <sup>(194)</sup> y el registro francés RATIO (*Research Axed on Tolerance of bIOtherapies*) <sup>(195)</sup> no se ha demostrado un aumento del riesgo de cáncer, incluido el linfoma, en pacientes expuestos a anti-TNF $\alpha$ .

En BIOBADASER, las reacciones relacionadas con la administración ocurrieron en el 6,3% de los pacientes con una incidencia de 18 casos/1.000 pacientes por año (IC del 95%, 16-20), siendo la frecuencia mayor con IFX que con ETN y ADA, así como en la AR y en las mujeres <sup>(181)</sup>.

### 2.3.2.- Otras terapias biológicas

#### Rituximab

El Rituximab (RTX), Mabthera ®, fue aprobado por la EMA en el año 1998. Está indicado en adultos para el tratamiento de la AR grave en combinación con MTX en pacientes que no respondieron a otros tratamientos incluyendo los anti-TNF $\alpha$ . También está indicado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin <sup>(196)</sup>.

Es un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B. Su acción terapéutica se basa en su capacidad de eliminar las células que expresan esta molécula de superficie.

Se administra a dosis de 1.000 mg en perfusión intravenosa, seguida, dos semanas más tarde, de una segunda perfusión intravenosa de la misma dosis <sup>(196)</sup>. Pueden administrarse ciclos sucesivos de forma regular cada 6 meses o a intervalos no continuos siempre y cuando el paciente haya presentado una eficacia clínica que persista durante 6 meses después de la administración de cada ciclo.

El evento adverso más frecuentes del RTX son las reacciones a la infusión y las infecciones. En relación a las reacciones a la infusión se ha observado que entre el 30 y 35% de los pacientes presentan esta reacción con la primera infusión y con menor frecuencia con las dosis sucesivas. Con respecto a las infecciones, la tasa de infecciones graves es mayor en los pacientes tratados con RTX que en aquellos que recibieron placebo, no obstante no se observaron infecciones oportunistas como la producida por el *Mycobacterium tuberculosis*<sup>(118)</sup>.

Los principales estudios que evalúan la eficacia del RTX en el tratamiento de la AR son el estudio DANCER (*Dose-Ranging Assessment: International Clinical Evaluation of Rituximabin Rheumatoid Arthritis*)<sup>(197)</sup> un estudio de fase IIb de valoración de dosis y el estudio REFLEX (*Randomized Evaluation of Long-Term Efficacy of Rituximab in RA*)<sup>(198)</sup> un estudio de fase III de respuesta insuficiente a fármacos antagonistas del TNF $\alpha$ . El RTX en combinación con el MTX también ha demostrado ser eficaz en inhibir la progresión del daño estructural en la AR<sup>(199)</sup>.

### Abatacept

En el año 2007 la EMA aprueba el abatacept (ABA), Orencia®, para el tratamiento de la AR moderada y grave en pacientes con una respuesta inadecuada a otros tratamientos incluyendo el MTX y los anti-TNF $\alpha$ . En pediatría ha sido aprobado para el tratamiento de la AIJ<sup>(200)</sup>.

El abatacept (CTLA 4- Ig) es una proteína de fusión que bloquea la señal de co-estimulación de los linfocitos T. El ABA representa el primer fármaco de una familia dirigida a alterar la función del linfocito T en enfermedades autoinmunes<sup>(118)</sup>.

Se administra en perfusión intravenosa a dosis que oscilan entre 500 mg a 1.000 mg según el peso del paciente. El ABA debe administrarse a las 2 y 4 semanas después de la primera perfusión, y a partir de entonces, cada 4 semanas<sup>(200)</sup>.

El ABA es un fármaco con un perfil de seguridad favorable que pueden ofrecer beneficios sustanciales sobre todo en aquellos pacientes con AR y un elevado riesgo de infección<sup>(118, 200)</sup>.

El ABA en combinación con MTX o con otro FAME ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la AR en diferentes grupos de pacientes: en pacientes con AR de reciente comienzo y sin exposición previa a FAMES, en aquellos con una respuesta inadecuada a FAMES y en aquellos que no responden a los anti-TNF $\alpha$ . Se ha observado al año de tratamiento una reducción significativa de la actividad de la enfermedad en pacientes tratados con ABA con una tasa de remisión que alcanzan hasta el 41 % en pacientes que habían recibido MTX y ABA<sup>(201)</sup>. En otro estudio en combinación con el MTX se ha demostrado que este fármaco es eficaz en retardar la progresión del daño radiográfico<sup>(202)</sup>.

## Anakinra

Fue aprobado en el año 2002 por la EMEA para el tratamiento de los signos y síntomas de la AR en combinación con MTX, en aquellos adultos que no hayan respondido bien a la administración de metotrexato en monoterapia.

Se administra por vía subcutánea a dosis de 100 mg/día<sup>(203)</sup>.

Anakinra (ANK), Kineret®, es una proteína antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RA). Es una glicoproteína inhibidora de la IL-1 que se une al receptor de alta afinidad de la IL-1 de la superficie celular bloqueando los efectos de esta interleuquina<sup>(10)</sup>.

El efecto adverso más frecuente asociado al tratamiento con ANK fue la presencia de una reacción en la zona de inyección en un elevado número de pacientes<sup>(203)</sup>.

Inicialmente la eficacia del ANK fue demostrada en monoterapia y en combinación con MTX en pacientes con AR. Se objetivó una mejoría de los signos y síntomas y un retraso en la progresión radiológica del daño articular<sup>(204)</sup>. Sin embargo aunque no existen estudios comparativos, su eficacia en general es menor que la descrita en relación con otras terapias biológicas. Así mismo, al inicio de su uso en la práctica clínica se objetivó un elevado número de pacientes que presentaban una reactivación de la enfermedad durante el tratamiento. Actualmente su uso está muy limitado a casos claramente refractarios a otros tratamientos<sup>(205)</sup>.

## Tocilizumab

El Tocilizumab (TCZ), RoActemra®, fue aprobado por la EMA en el año 2009 para el tratamiento de la AR moderada a grave en pacientes que hayan presentado una respuesta inadecuada al tratamiento con otros fármacos incluyendo el MTX o anti-TNF $\alpha$ . Puede utilizarse en monoterapia o en combinación con MTX. También está indicado como tratamiento de la AIJ<sup>(206)</sup>.

Este fármaco es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de la interleucina 6 (IL-6R).

El TCZ se administra a través de una perfusión intravenosa de una hora de duración a dosis de 8 mg/kg cada 4 semanas, pero no menos de 480 mg<sup>(206)</sup>.

El tratamiento con TCZ se asoció a un aumento del colesterol total, colesterol LDL (*Low Density Lipoproteins*), colesterol HDL (*High density lipoprotein*), triglicéridos, de la apolipoproteína A1 y B, y del cociente LDL/HDL. Otro efecto adverso frecuente es la neutropenia que suele ser leve, transitoria y no asociada a infecciones. También se han registrado aumentos de las transaminasas que no se asociaron a hepatitis o disfunción hepática grave<sup>(118,206)</sup>.

El estudio CHARISMA (*Chungai Humanised Anti-human Recombinant Interleukin-Six Monoclonal Antibody*)<sup>(207)</sup> y el estudio OPTION (*Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis*)<sup>(208)</sup> valoraron la eficacia del TCZ combinado con el MTX en comparación con el MTX en monoterapia y demostraron que el TCZ asociado al MTX es más eficaz que el MTX en monoterapia.

El estudio SAMURAI (*Study of Active controlled Monotherapy Used for Rheumatoid Arthritis an IL-6 Inhibitor*) evaluó la eficacia del TCZ para inhibir la progresión del daño estructural evaluado por medio de los cambios radiográficos. La eficacia fue manifiesta a la semana 28 y más evidente a la semana 52 de tratamiento con cambios significativamente menores que en los pacientes tratados con FAMES<sup>(209)</sup>. También se comparó la eficacia del TCZ en relación con el MTX, ambos en monoterapia. En el estudio AMBITION (*Actemra versus Methotrexate double-Blind Investigative Trial In mONotherapy*) un estudio de fase III, multicéntrico de no inferioridad en el que se comparó la monoterapia con TCZ con el MTX en monoterapia, el análisis demostró que el TCZ fue superior al tratamiento con MTX a la semana 24 de tratamiento. El TCZ es la única terapia biológica que ha demostrado su superioridad en monoterapia en comparación con el MTX en monoterapia<sup>(210)</sup>.

## 2.4.- Valoración de la actividad inflamatoria en la Artritis Reumatoide

La utilización de índices que resuman la información de varios parámetros en un solo indicador es un procedimiento útil y válido en la evaluación de la actividad de la enfermedad. Según la SER<sup>(211)</sup> en la evaluación estandarizada de la AR se recomiendan utilizar las siguientes medidas:

### 1) Valoración de la actividad

- Número de articulaciones dolorosas (NAD)
- Número de articulaciones tumefactas (NAT)
- Valoración global de la enfermedad por el paciente (VGP) utilizando la escala analógica visual de 0 a 100
- Valoración global de la enfermedad por el médico (VGM) utilizando la escala analógica visual de 0 a 100
- Reactantes de fase aguda (velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva (PCR))

### 2) Valoración del daño estructural

- Exploración radiológica que incluya manos y pies anualmente durante los primeros 3-4 años o cuando se inicie tratamiento con un agente biológico.

### 3) Valoración funcional

- La SER recomienda el uso de cuestionarios específicos para la valoración funcional del paciente al menos una vez al año<sup>(211)</sup>.

El HAQ (*Stanford Health Assessment Questionnaire*) se desarrolló en 1980 como una medida específica de la discapacidad funcional de pacientes con AR y es el

cuestionario más utilizado en estudios poblacionales y en la práctica clínica en la AR <sup>(212,213)</sup>.

La recogida sistemática de los datos recomendados permite el cálculo de los diferentes índices que han sido validados para realizar una estimación objetiva de la actividad de la enfermedad:

- Índice DAS (*Disease Activity Score*)
- Índice DAS28 (*Disease Activity Score in 28 Joints*)
- SDAI (*Simplified Disease Activity Index*)
- CDAI (*Clinical Disease Activity Index*)

El DAS y su derivado el DAS28 son considerados adecuados en término de conveniencia para la práctica clínica y relevancia en la medición de la actividad de la enfermedad y su progresión <sup>(214)</sup>.

El índice DAS para la AR fue originalmente desarrollado a comienzo de los años 90 por van Der Heijde et al <sup>(215)</sup>, basándose en el índice articular de Ritchie <sup>(216)</sup> que incluye 44 articulaciones dolorosas y tumefactas, la VSG y la VGP.

$$\text{DAS} = 0,54 (\sqrt{\text{IR}}) + 0,065 (\text{NAT44}) + 0,33 (\text{In VSG}) + 0,0072 (\text{VGP})$$

EL índice DAS28 tiene en cuenta 28 articulaciones dolorosas y 28 articulaciones tumefactas, la valoración global del paciente y la VSG. También puede calcularse utilizando el valor de PCR en mg/dl en lugar del valor de la VSG <sup>(217,218)</sup>.

$$\text{DAS28} = 0,56 (\sqrt{\text{NAD28}}) + 0,28 (\sqrt{\text{NAD28}}) + 0,70 (\text{In VSG}) + 0,014 (\text{VGP})$$

Recientemente se ha propuesto otro índice similar, el SDAI <sup>(219)</sup> que deriva de un índice desarrollado para la valoración de la actividad de las artritis reactivas <sup>(220)</sup>. El SDAI utiliza una fórmula matemática más simple que la utilizada para el DAS28. Se calcula mediante una simple suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, la VGM, la VGP y la concentración de PCR.

$$\text{SDAI} = \text{NAD28} + \text{NAT28} + \text{VGP} + \text{VGM} + \text{PCR (mg/dl)}$$

Al igual que con el índice DAS se ha creado un índice SDAI modificado por Aletaha et al <sup>(221)</sup>, el índice CDAI que se ha desarrollado para ser utilizado en caso de no disponer de los reactantes de fase aguda de forma inmediata.

$$\text{CDAI} = \text{NAD28} + \text{NAT28} + \text{VGP} + \text{VGM}$$



En la siguiente tabla se observan los diferentes grados de actividad de la enfermedad considerando los diferentes índices descritos anteriormente. Actualmente la SER recomienda los índices DAS28 y SDAI para su uso en la práctica clínica<sup>(211,218)</sup>.

**Tabla 2.** Puntos de corte para las categorías de actividad según los índices DAS, DAS28 y SDAI

	<b>Categoría</b>	<b>Definición</b>
<b>DAS</b>	Remisión Actividad baja Actividad moderada Actividad alta	<1,6 <2,4 2,4 < DAS28 < 3,7 ≥ 3,7
<b>DAS28</b>	Remisión Actividad baja Actividad moderada Actividad alta	<2,6 <3,2 3,2 < DAS28 < 5,1 ≥ 5,1
<b>SDAI</b>	Remisión Actividad baja Actividad moderada Actividad alta	<5 <20 20 < SDAI < 40 ≥ 40
<b>CDAI</b>	Remisión Actividad baja Actividad moderada Actividad alta	≤ 2,8 ≤ 10 ≤ 22 >40

La remisión clínica representa una ausencia de actividad de la enfermedad, aunque en la AR es un estado que casi ningún paciente con enfermedad podría alcanzar. Por lo tanto a nivel práctico la remisión clínica se define como la ausencia completa de actividad de la enfermedad o un nivel de actividad de la enfermedad tan baja que no es molesto para el paciente y que augura un buen pronóstico<sup>(222)</sup>. Recientemente, un comité compuesto por miembros del ACR y del EULAR, elaboraron una nueva definición de remisión para su uso en ensayos clínicos. Estos criterios se describen en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Nuevos criterios del ACR/EULAR de remisión clínica de la Artritis Reumatoide

<p><b>Definición categórica (hay que cumplir todos los criterios)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Articulaciones dolorosas ≤1</li> <li>2.- Articulaciones tumefactas ≤1</li> <li>3.- PCR ≤1 mg/dl</li> <li>4.- Valoración de la actividad por el paciente ≤1 (escala de 0-10)</li> </ol>
<p><b>Definición basada en un índice</b></p> <p>SDAI ≤3,3</p>

## 2.5.- Criterios de respuesta clínica

En las enfermedades crónicas como la AR, es necesario valorar la respuesta al tratamiento por lo que se han desarrollado herramientas que se utilizan para medir la actividad de la enfermedad en la práctica clínica en respuesta a un determinado tratamiento. En la AR, tanto en los ensayos clínicos como en la práctica clínica, se han utilizado multitud de medidas que hacían muy difícil la comprensión y la homogeneización de los resultados<sup>(223)</sup>. Para dar consistencia y uniformidad, el *American College of Rheumatology* (ACR) o la *EUropean League Against Rheumatism* (EULAR), crearon unos criterios para ser utilizados en la practica diaria y en los ensayos clínicos.

Los índices integran varias medidas en un único valor que las representa, con lo que se evita la multiplicidad de las variables, se eliminan las redundantes y menos representativas y se mejoran la validez y la sensibilidad. Al combinar variables clínicamente importantes, se aumenta la consistencia de la evaluación entre situaciones diferentes y se aumenta el poder de discriminación, lo que permite reducir la muestra. En cambio, tienen la dificultad de su comprensión, o lo que es lo mismo, cómo y por qué se unen unas variables y no otras, y el método empleado para determinar su peso, ya que en los índices no todas las variables tienen el mismo efecto en el resultado final<sup>(224,225)</sup>.

### Respuesta EULAR y ACR

El criterio EULAR se calcula utilizando el índice DAS y su modificación, el índice DAS28, clasificando la mejoría en: ausente, moderada y buena. Para el uso de estos criterios no sólo hace falta una mejoría sustancial del índice DAS28, que se define como un cambio de 1,2 puntos desde la semana basal a un tiempo determinado de la evolución de la enfermedad, sino que también es importante el grado de actividad del paciente después del tratamiento (alto, moderado o bajo<sup>(226)</sup>). De esa forma una mejoría del DAS $>1,2$  con un DAS actual  $<2,4$  o  $<3,2$  con el índice DAS28, se considera una respuesta "buena". Una disminución del DAS28 menor de 1,2 y mayor de 0,6 con un DAS actual menor a 3,7 o menor a 5,1 si se considera el DAS28, es una respuesta "moderada". Un respuesta insatisfactoria o "ausente" se considera aquel paciente que no cumple ninguno de los criterios anteriormente descritos tal y como se observa en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Definición de la respuesta EULAR

Disminución en el DAS/DAS28				
DAS28 actual	DAS actual	$>1,2$	$>0,6$ y $<1,2$	$<0,6$
$<3,2$	$<2,4$	Buena		
$>3,2$ y $<5,1$	$>2,4$ y $<3,7$		Moderada	
$>5,1$	$>3,7$			No mejoría

Los criterios de Paulus se describieron en 1990<sup>(227)</sup>. Eran criterios que incluían la velocidad de sedimentación globular (VSG), las articulaciones dolorosas y tumefactas, la rigidez matutina y la valoración del médico y del paciente. Se requerían una mejoría de, al menos, el 20% de 4 de 6 variables. Este índice era utilizado para discriminar entre pacientes tratados con placebo y FAMES y durante muchos años, se utilizó como medida de eficacia.

Los criterios de mejoría propuestos por el ACR, se basan en estos últimos criterios y son ampliamente utilizados en la práctica clínica. Estos criterios fueron elaborados por Felson en el año 1995 basándose en los criterios de Paulus y valoran la respuesta terapéutica, pero no miden valores absolutos de actividad, sino sus cambios porcentuales. Una mejoría ACR20 requiere una mejoría de, al menos, un 20% en el número de articulaciones dolorosas y tumefactas y al menos una reducción del 20% en 3 de las 5 variables restantes valoradas, tal y como se observa en el cuadro 5. Una respuesta ACR50, 70 o 90 requieren al menos una reducción del 50, el 70 o el 90%, respectivamente<sup>(228)</sup>.

**Cuadro 5.** Criterios de la respuesta ACR

Se requiere { <ul style="list-style-type: none"> <li>≥20% de mejoría en el número de articulaciones dolorosas</li> <li>≥20% de mejoría en el número de articulaciones tumefactas</li> </ul>
+
≥20% de mejoría en 3 de los 5 parámetros: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Valoración del dolor por el paciente</li> <li>• Valoración global por el paciente</li> <li>• Valoración global por el médico</li> <li>• HAQ</li> <li>• Reactantes de fase aguda (VSG or PCR)</li> </ul>

El principal inconveniente de estos criterios es que no consideran el grado de actividad de la enfermedad actual por lo que la guía de la SER<sup>(119)</sup> propone agregar a estos criterios la siguiente consideración:

**-Respuesta satisfactoria:** cumplimiento de los criterios ACR20, menos de 6 articulaciones tumefactas y ausencia de afectación en cualquier circunstancia del paciente que produzca pérdida intolerable de la capacidad funcional en opinión del paciente o del médico.

**-Respuesta insatisfactoria:** no cumplimiento de los criterios de respuesta satisfactoria.

### **3.- Biomarcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ en la Artritis Reumatoide**

Desde la introducción de las terapias biológicas en el tratamiento de la AR el pronóstico de esta enfermedad ha cambiado de forma considerable. No obstante aproximadamente un 30% de los pacientes con AR no responden a estos tratamientos<sup>(229)</sup>. Hasta el momento no existe ningún biomarcador validado que pueda ser utilizado como un predictor de respuesta en la práctica clínica y tampoco se conoce bien el mecanismo biológico por el cual algunos pacientes no responden a estos tratamientos<sup>(230)</sup>.

En este apartado se presenta una revisión de los estudios enfocados a identificar biomarcadores de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en la AR. Hemos ordenado la revisión de acuerdo a la siguiente clasificación: biomarcadores no genéticos (epidemiológicos, clínicos, serológicos e histológicos) y biomarcadores genéticos.

#### **3.1.- Biomarcadores no genéticos de respuesta**

##### **3.1.1.- Biomarcadores epidemiológicos**

Existen varios estudios en pacientes con AR que evalúan al género como un factor predictor de respuesta terapéutica. Se ha observado que las mujeres tienen un peor curso de la enfermedad a pesar de recibir el mismo tratamiento por lo que se considera que los hombres tienen una mayor probabilidad de alcanzar mejores respuestas a un determinado tratamiento. Así mismo se ha considerado en varios estudios que el género masculino puede ser un factor predictor de buena respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ <sup>(229,231,232)</sup> y que el género femenino es un predictor independiente de peor pronóstico de la enfermedad<sup>(233)</sup>.

Sin embargo hay que tener en cuenta determinados factores de confusión que pueden interferir en la evaluación de la respuesta, como son las diferencias entre géneros en cuanto a la percepción del dolor o la menor masa muscular de las mujeres<sup>(234,235)</sup>.

No obstante recientemente se ha publicado un estudio basado en el registro DANBIO (*NAtion wide registry of BIological therapies in Denmark*)<sup>(235)</sup> donde se compara la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con una AR de inicio reciente ( $\leq 2$  años) y con una AR establecida ( $> 2$  años) y analizan la respuesta considerando la diferencia de género. Este estudio concluye que en pacientes con AR de inicio reciente, los hombres tienen una mayor probabilidad de alcanzar una respuesta EULAR moderada / buena a los 48 meses en comparación con las mujeres. Esta diferencia es significativa sobre todo a partir de los 6 meses de tratamiento. Sin embargo cuando se estudia a la población con una AR establecida no se observan diferencias significativas en la respuesta al tratamiento, sugiriendo que el género masculino es un predictor de respuesta, pero solo cuando se consideran las AR de reciente comienzo.

En la siguiente tabla se observan los estudios publicados en relación al género como un biomarcador de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$

**Tabla 3.** Estudios que evalúan al género como biomarcador epidemiológico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	El sexo masculino es un predictor de remisión
Mancarella et al, 2007	1.257	IFX/ETA/ADA	24	HAQ DAS28<2,6	
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	
Kristensen et al, 2008	1.565	IFX/ETA/ADA	12	EULAR ACR DAS28<2.6	No asociación con el género
Jawaheer et al, 2012	2.129	IFX/ETA/ADA	24	EULAR	El sexo masculino es un predictor de buena respuesta en AR de reciente comienzo

La edad podría jugar también un papel importante como predictor de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Así en el estudio GISEA (*Gruppo Italiano di Studio sulle Early Arthritides*)<sup>(232)</sup> se observó que los pacientes menores de 53 años que iniciaban el tratamiento con anti-TNF $\alpha$ , tenían más probabilidades de alcanzar la remisión si se comparaban con pacientes de mayor edad. Estos hallazgos coinciden con el estudio del grupo de Burmester et al<sup>(229)</sup> que objetivaron que los pacientes mayores de 40 años alcanzaban menos la remisión en el seguimiento a tres años. Sin embargo estos hallazgos no han sido confirmados por otros estudios<sup>(231)</sup>.

En la tabla 4 se presentan los estudios más relevantes que entre otros datos evalúan el efecto de la edad en la respuesta al tratamiento con terapias de acción anti-TNF $\alpha$ .

Tal y como se ha comentado previamente el hábito tabáquico es un factor de riesgo en la susceptibilidad de desarrollar AR. Este hábito se asocia a formas más graves de la enfermedad y a la presencia de manifestaciones extra-articulares (i.e. nódulos reumatoides y vasculitis)<sup>(236,237,238,239)</sup>.

**Tabla 4.** Estudios que evalúan a la edad como biomarcador epidemiológico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	La edad no está asociada con la respuesta ni con la remisión
Mancarella et al, 2007	1.257	IFX/ETA/ADA	24	HAQ DAS28<2,6	Los pacientes con $\geq 53$ años, tienen menor probabilidad de alcanzar la remisión
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	Los pacientes de $\geq 40$ años tienen menor probabilidad de alcanzar la remisión

También ha sido estudiado el hábito tabáquico como factor predictor de respuesta al tratamiento. Un estudio reciente ha sugerido que los pacientes con AR que fuman tienen una necesidad de recibir mayor número de FAMES de forma que la eficacia de estos agentes antirreumáticos pueda estar reducida en pacientes fumadores <sup>(240)</sup>.

Específicamente con respecto a los fármacos con acción anti-TNF $\alpha$ , Hyrich et al <sup>(231)</sup> observaron una asociación estadísticamente significativa entre el hábito de fumar y una menor respuesta al tratamiento con IFX.

Esto podría ser explicado por la asociación bien establecida entre el hábito tabáquico y el incremento en la producción del FR y de anticuerpos anti-CCP, aunque este último solo en pacientes que presentan el EC <sup>(22,239)</sup>.

Otra posibilidad es que el tabaco en pacientes que reciben un agente biológico podría estar asociado con el incremento en la producción de anticuerpos anti-químicos o anticuerpos HACA (*Human Anti-Chimeric Antibody*) aunque esta relación no ha sido aun demostrada. La presencia de estos anticuerpos ha sido relacionada con concentraciones de IFX disminuidas en suero y con una menor respuesta al tratamiento <sup>(241,242)</sup>.

También se debe considerar la alteración de la farmacocinética del anti-TNF $\alpha$  en los pacientes fumadores. Por un lado podría interferir en la absorción de estos fármacos y por otro es posible que los fumadores tengan altas concentraciones en suero de TNF $\alpha$  y/o otros mediadores inflamatorios que predispongan a una mayor resistencia a la terapia con anti-TNF $\alpha$ . Existen evidencias de que determinadas citoquinas y metaloproteasas de matriz están elevadas en los pacientes fumadores <sup>(243, 244)</sup>.

También es importante tener en cuenta la inversa relación que existe entre el número de paquetes de cigarrillos/año y la mejoría del DAS28. Con respecto a este punto, Matthey et al<sup>(241)</sup> observaron que la respuesta terapéutica está asociada a la intensidad del hábito tabaquico previo, independientemente del estatus actual. Esto no coincide con un estudio publicado recientemente que observa que los pacientes que nunca habían fumado tenían más posibilidades de alcanzar una buena respuesta a los tres meses de tratamiento con MTX y anti-TNF $\alpha$  con respecto a los que actualmente estaban fumando, pero esta diferencia no fue significativa si se los comparaba con los pacientes ex-fumadores<sup>(245)</sup>.

En la siguiente tabla se presentan los estudios más relevantes que evalúan entre otros datos el efecto del hábito tabaquico en la respuesta al tratamiento con terapias de acción anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 5.** Estudios que evalúan al hábito tabaquico como biomarcador epidemiológico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28 < 2,6	Los pacientes fumadores activos que son tratados con IFX tienen menor probabilidad de alcanzar buena respuesta No se encontró asociación con ETA
Matthey DL et al, 2009 #	154	IFX/ETA/ADA	12/48	EULAR	
Burmester et al, 2008	1.257	ADA	12	DAS28 < 2,6 SDAI < 3,3 CDAI < 2,8	No existe diferencias entre los pacientes no fumadores y los que alguna vez han fumado
Abhishek et al, 2010*	290/65/40	IFX/ETA/ADA	12	EULAR DAS28 < 2,6	Los pacientes fumadores activos que reciben ETA tienen menor probabilidad de alcanzar la remisión
Saevasdottir et al, 2011	535	IFX/ETA/ADA	12	EULAR DAS28 < 2,6	En AR de reciente comienzo, los fumadores activos tienen menor probabilidad de alcanzar una buena respuesta y la remisión

\*No se analizaron los pacientes con IFX y ADA debido al tamaño de la muestra.

#Relación inversa entre el índice DAS28 y el número de paquetes/año.

### 3.1.2.- Biomarcadores clínicos

En relación a los predictores clínicos relacionados con la actividad de la enfermedad, la BSRBR (*British Society of Rheumatology Biologics Register*)<sup>(231)</sup> ha publicado un estudio basado en el registro de 2.879 pacientes tratados con IFX y ETA, donde se observó que la puntuación en la escala del HAQ, el sexo femenino y el estado de fumador activo, esto último en pacientes tratados con IFX, fueron identificados como predictores negativos de respuesta en pacientes con AR tratados con estos fármacos.

El uso concomitante de MTX y la baja puntuación del HAQ en la semana basal de tratamiento fueron identificados como predictores de una buena respuesta al tratamiento a los 3 meses de seguimiento, lo cual coincide con los resultados de otros estudios<sup>(231, 232, 246, 247)</sup>.

En la siguiente tabla se presentan los estudios más relevantes que evalúan entre otros datos el HAQ en la respuesta al tratamiento con terapias de acción anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 6.** Estudios que evalúan el HAQ como biomarcador clínico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2.6	Existe una asociación inversa entre el valor del HAQ de la semana basal y la remisión clínica del paciente
Mancarella et al, 2007	1.257	IFX/ETA/ADA	24	HAQ DAS28<2.6	
Kristensen et al, 2008	1.565	IFX/ETA/ADA	12	EULAR ACR DAS28<2.6	
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	

Varios estudios coinciden que la actividad de la enfermedad medida por el índice DAS28 al inicio del tratamiento con FAMES es un factor pronóstico muy importante para alcanzar la remisión<sup>(248,249)</sup>. Verstappen et al<sup>(250)</sup> observaron que aquellos pacientes con un menor número de articulaciones dolorosas y tumefactas a la semana basal de tratamiento con diferentes FAMES tienen una mayor probabilidad de alcanzar la remisión. Así mismo en el registro Alemán de terapias biológicas, RABBITS<sup>(251)</sup> (*German acronym for Rheumatoid Arthritis-Observation of Biologic Therapy*) se observó que los pacientes con un DAS28 menor a 5,1 en la semana basal tenían mayores tasas de remisión (30%) definida por el índice DAS28 en comparación a los que presentaban al inicio del tratamiento un DAS28 mayor a 6 (8.5%).



Keystone et al <sup>(252)</sup> realizaron un subanálisis de los estudios TEMPO <sup>(167)</sup> (*Trial of Etanercept and Methotrexate With Radiographic Patient Outcomes*) y ERA <sup>(253)</sup> (*Early Rheumatoid Arthritis*) y observaron que en general los pacientes con moderada actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  alcanzaban una mejor respuesta a los 6 meses con respecto a los pacientes con elevados índices de actividad a la semana basal.

Aletaha et al <sup>(254)</sup>, concluyeron que la actividad de la enfermedad medida por los índices SDAI, DAS28 o CDAI antes del inicio del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  y sobre todo al mes de iniciado el tratamiento está significativamente asociada a la actividad de la enfermedad al año de seguimiento. Otros estudios similares llegan a la misma conclusión <sup>(229,248)</sup> exceptuando un estudio basado en el registro británico <sup>(231)</sup> donde no se objetiva una asociación significativa entre el DAS28 a la semana basal y la respuesta al tratamiento.

En la siguiente tabla se presentan los estudios más importantes que evalúan la influencia del índice DAS28 a la semana basal y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 7.** Estudios que evalúan el índice DAS28 a la semana basal como biomarcador clínico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	El DAS28 (SB) no predice la respuesta al tratamiento
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	Pacientes con DAS28 (SB)>5,1 tienen peor respuesta al tratamiento con ADA
Kristensen et al, 2008	1.565	IFX/ETA/ADA	12	EULAR ACR DAS28<2,6	Se observó que el DAS28 (SB) tiene una relación inversa con la respuesta EULAR y la remisión, y una relación directa con la respuesta ACR
Keystone E et al, 2009	201	ETA	12	DAS28<2,6	Pacientes con DAS28 (SB)>5,1 tienen peor respuesta al tratamiento con ETA

**SB:** Semana basal

Con respecto a otros factores clínicos no relacionados con la propia AR, el estudio ReAct (*Research in Active RA trial*)<sup>(229)</sup> objetivó que los pacientes que presentaban más de una morbilidad tenían peor respuesta al tratamiento con ADA alcanzando menos la remisión. Hyrich et al<sup>(231)</sup> sin embargo no encontraron asociación significativa entre la presencia de comorbilidades y la remisión tanto con el tratamiento con ETA como con el tratamiento con IFX.

En la siguiente tabla se observan los estudios publicados que entre otras variables analizan el número de comorbilidades asociadas a la AR y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 8.** Estudios que evalúan la comorbilidad como biomarcador clínico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	No se encontró asociación entre el número de comorbilidades y la respuesta al tratamiento y la remisión
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	Pacientes con más de una comorbilidad tienen menor probabilidad de alcanzar la remisión

El número de FAMES previo al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  también ha sido estudiado como posible biomarcador de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Al respecto se ha publicado un estudio observacional en una cohorte transversal que incluyó a 111 pacientes con AR que estaban siendo tratados con un fármaco anti-TNF $\alpha$  y se estudiaron los factores predictores de remisión. Se observó que el número de FAMES previos era inversamente proporcional a la tasa de remisión en estos pacientes<sup>(255)</sup>. Esto coincide con el registro británico<sup>(231)</sup> pero difiere de lo publicado por Burmester et al<sup>(229)</sup>, ya que estos últimos autores no observaron una asociación significativa entre el número de FAMES previos y la remisión clínica.

En la siguiente tabla se presentan los estudios realizados para evaluar la influencia del número de FAMES previos en la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 9.** Estudios que evalúan el número de FAMES previos como biomarcador clínico de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Liang et al, 2005	322	IFX/ETA/ADA	Transversal	DAS28<2,6	El número de FAMES previos es inversamente proporcional a la probabilidad de alcanzar la remisión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	El número de FAMES previos no está asociado con la probabilidad de alcanzar la remisión

### 3.1.3.- Biomarcadores serológicos

Aunque existen múltiples estudios que relacionan tanto el FR como los anticuerpos anti-CCP con el fenotipo y el pronóstico de la enfermedad, poco se sabe acerca de la influencia de estos anticuerpos en la respuesta al tratamiento con fármacos con acción anti-TNF $\alpha$ .

Potter et al <sup>(256)</sup> llevaron a cabo un estudio para establecer la asociación entre la presencia del FR, los anticuerpos anti-CCP y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Se incluyeron 642 pacientes con AR en tratamiento con tres anti-TNF $\alpha$  (IFX, ETA y ADA) y concluyeron que la presencia de estos auto-anticuerpos era un predictor de menor respuesta a los 6 meses de seguimiento. Es importante señalar que en este estudio no se había incluido un grupo control para poder establecer con certeza esta asociación y que la determinación de estos anticuerpos fue realizada en algunos pacientes después del inicio del tratamiento y no a la semana basal.

En un subestudio del registro BSRBR se observó que la presencia del FR y de los anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR tratados con biológicos estaba asociada a una menor respuesta al tratamiento y que la utilización de MTX en forma concomitante con ETA estaba asociado a una mejor respuesta <sup>(231)</sup>.

Mancarella et al <sup>(232)</sup> publican un estudio que incluyó 591 pacientes con AR y tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ , que fueron seguidos durante 6 meses. En este estudio se concluyó que los pacientes con FR negativo presentaban de forma más frecuente una buena respuesta EULAR.

En otro estudio italiano de 132 pacientes con AR avanzada que recibían terapia anti-TNF $\alpha$  y seguidos durante un año, se observó que los títulos del FR en

todos sus isotipos descendieron en forma significativa al año de tratamiento, mientras que los títulos de los anticuerpos anti-CCP no se modificaron de forma significativa <sup>(257)</sup>.

No obstante Klassen et al <sup>(85)</sup> observaron que contrariamente a lo publicado con anterioridad la presencia de FR y de anticuerpos anti-CCP estaba relacionada con una buena respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Aunque estos hallazgos no tienen un poder estadístico considerable generan una duda razonable y obligan a realizar estudios similares con criterios unificados para valorar la influencia de estos anticuerpos sobre la respuesta a estos fármacos.

Finalmente Fisher et al <sup>(258)</sup>, han publicado un estudio donde se incluyeron 450 muestras de pacientes con AR que recibían tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Se analizó la presencia de anticuerpos citrulinados  $\alpha$ -enolasa, vimentina y péptidos fibrinogénicos (anti-cFib) y se determinó la actividad mediante el DAS28 a la semana basal y a los 6 meses del tratamiento. En este estudio se observó que tanto los anticuerpos anti-cFib como los anticuerpos anti-CCP estaban asociados a una pobre respuesta. En contraste, los anticuerpos CEP-1 y cVim, los cuales se ha demostrado que están fuertemente asociados con el epítotope compartido, no estuvieron asociados con la respuesta.

En la tabla 10 se observan los estudios más relevantes que evalúan la influencia de los anticuerpos FR y anti-CCP en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

Otro anticuerpo que también podría tener relación con la respuesta es el anticuerpo anti-Ro. Este anticuerpo se detectó en el 6% de pacientes con AR y está asociado a la presencia de un Síndrome de Sjögren secundario <sup>(92)</sup>. En un estudio <sup>(259)</sup> que evaluaba la relación entre la presencia de este anticuerpo en pacientes con AR y la respuesta al tratamiento con inhibidores del TNF $\alpha$ , se observó que los pacientes con anti-Ro positivo respondían menos al tratamiento con IFX que los pacientes anti-Ro negativo. No pudo evaluarse la relación con ETA y ADA por el escaso número de pacientes incluidos con estos tratamientos.

En cuanto a otros marcadores serológicos de respuesta, un estudio español <sup>(260)</sup> investigó la influencia de los valores séricos de RANKL (*receptor activador for nuclear factor kappa B ligand*) y de la OPG (*osteoprotegerina*) en pacientes con AR sobre la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . En este estudio se incluyeron 75 pacientes con AR que iniciaban tratamiento con IFX y ADA y se determinaron las concentraciones de RANKL y OPG en suero, a la semana basal y a las semanas 12, 14, 28 y 30. Los datos sugirieron que los pacientes con bajos valores de RANKL a la semana basal alcanzaban más la remisión, mientras que no se observó una asociación significativa entre los valores de la OPG a la semana basal y la respuesta terapéutica.

En otro estudio que incluyó a 60 pacientes tratados con IFX se observó que los valores elevados de Apolipoproteína A-1 a la semana basal, mayor componente de las HDL, son un factor predictor de buena respuesta. A diferencia, los valores séricos elevados del factor plaquetario 4, quimioquina especí-

fica de los gránulos plaquetarios, se asocian de forma significativa a una menor respuesta terapéutica<sup>(261)</sup>.

**Tabla 10.** Estudios que evalúan el FR y los anticuerpos anti-CCP como biomarcadores serológicos de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Hyrich et al, 2006	2.879	IFX/ETA	24	EULAR DAS28<2,6	El FR (+) no se asocia con la respuesta EULAR ni con la remisión
Bobbio-Pallavicini et al, 2007	132	IFX/ETA/ADA/MTX	48	EULAR	Valores elevados de FR IgA (SB) se asocia a una peor respuesta al anti-TNF $\alpha$ El FR (+) o anti-CCP (+) no se asocian a la respuesta EULAR
Mancarella et al, 2007	1.257	IFX/ETA/ADA	24	HAQ DAS28<2,6	El FR (+) se asocia a menor remisión
Burmester et al, 2008	6.610	ADA	12	DAS28<2,6 SDAI<3,3 CDAI<2,8	El FR (+) no se asocia con la remisión
Atzeni et al, 2009	1.005	IFX/ETA/ADA	48	EULAR HAQ DAS28<2,6	El FR (+) o anti-CCP (+) no se asocian a la respuesta EULAR ni a la remisión
Potter et al, 2009	642	IFX/ETA/ADA*	24	EULAR	El FR (+) y/o anti-CCP (+) están asociados a una peor respuesta al anti-TNF $\alpha$
Klassen et al, 2011	101	IFX	16	EULAR	El FR (+) y los anti-CCP (+) (SB) se asocian a una buena respuesta
Fisher et al, 2012	450	IFX/ETA/ADA	24	EULAR	Los anti-CCP(+) están asociados a una peor respuesta

**SB:** semana basal, ADA\* excluido del análisis por presentar escaso número de pacientes

La determinación en el suero de las concentraciones de TNF $\alpha$  se presenta como un atractivo candidato de estudio para la identificación de biomarcadores de respuesta. Sin embargo, su determinación sistemática mediante ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es particularmente difícil con un umbral muy bajo cerca del límite de detección. No obstante las concentraciones de esta citoquina en suero antes del inicio del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  no estuvieron en relación con la respuesta en un estudio francés que incluyó a 50 pacientes que recibían tratamiento con IFX<sup>(262)</sup>.

Como la determinación del TNF $\alpha$  por ELISA no se demostró útil para predecir la respuesta, el mismo grupo francés llevó a cabo un estudio funcional del TNF $\alpha$  circulante en 20 pacientes con AR. En este estudio se observó que las concentraciones elevadas del TNF $\alpha$  circulante activo estaban asociados a una buena respuesta al IFX con un valor predictivo positivo del 90%<sup>(263)</sup>.

Se ha estudiado también la correlación entre la respuesta terapéutica y las células *Th17* (*Helper-Type 17*) que secretan la IL-17. Esta citoquina participa en la inflamación y destrucción de los tejidos por medio de la inducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y metaloproteasas de matriz. Esto ha sido foco de atención de un estudio publicado por Chen et al<sup>(264)</sup> que observaron que el número de células *Th17* y la concentración de IL-17 en suero de pacientes con AR estaban elevadas en pacientes que no respondían adecuadamente al tratamiento con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$ . Se observó además que las concentraciones de IL-17 a la semana basal eran superiores en pacientes no respondedores en comparación con los respondedores a este tipo de tratamiento. Esta teoría es apoyada por otro estudio publicado recientemente en donde se señala que la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  está asociada a la concentración de *Th17*/IL-17 previa al inicio del tratamiento<sup>(265)</sup>.

### 3.1.4.- Biomarcadores histológicos

En un grupo importante de pacientes con AR, las células infiltrantes de la membrana sinovial se organizan de forma similar a los centros germinales de los órganos linfoides secundarios (sinovitis folicular). Estas estructuras contienen linfocitos B y T rodeados de células dendríticas. En otros pacientes, se forman acumulaciones que carecen de células dendríticas y contienen ambas estirpes B y T, pero sin la típica reacción germinal. Menos frecuentemente, algunas sinoviales reumatoides presentan infiltrados inflamatorios que se disponen en forma difusa sin organogénesis linfoide determinada<sup>(266)</sup>.

La formación de agregados foliculares o agregados granulomatosos linfoides se ha asociado a una mayor producción de TNF $\alpha$  y a una enfermedad más agresiva, en contraste con la presencia de una infiltración linfocitaria en forma difusa.

Cañete et al<sup>(267)</sup> han observado que la presencia de la neogénesis linfoidea es un biomarcador de mala respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . También observaron que la neogénesis linfoidea puede ser reversible después de un corto periodo

de tratamiento con anti-TNF $\alpha$  y que su desaparición está asociada a una buena respuesta clínica.

Sin embargo Klassen et al <sup>(68)</sup> objetivaron que los pacientes con agregados linfoides en el tejido sinovial presentaban una mejor respuesta al tratamiento con IFX que aquellos pacientes que presentaban un infiltrado linfoide difuso. En ambos estudios se han utilizado diferentes criterios histológicos para el análisis por lo que no se pueden extraer datos concluyentes. Esta discrepancia refuerza la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios diseñados con criterios más homogéneos.

Otro estudio publicado por Izquierdo et al <sup>(268)</sup>, observó una disminución del revestimiento de fibroblastos en la membrana sinovial en pacientes con buena respuesta a anti-TNF $\alpha$  por lo que este hallazgo también podría ser considerado un predictor de buena respuesta pero los datos disponibles al respecto aun son escasos.

En la siguiente tabla se observan los principales estudios que valoran los biomarcadores histológicos en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

**Tabla 11.** Estudios que evalúan los hallazgos histológicos como biomarcadores de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Cañete et al , 2009	86	IFX/ETA/ADA	12	EULAR	La neogénesis linfoidea sinovial es un predictor de peor respuesta
Klaasen R et al , 2009	57	IFX	16	EULAR	Los pacientes con agregados linfocitarios en tejido sinovial tienen una mejor respuesta al tratamiento con IFX que los que tienen infiltrado linfocitario difuso
Izquierdo et al, 2011	48	IFX/ETA/ADA	40	EULAR	Se observa una disminución del revestimiento de fibroblastos en la membrana sinovial de pacientes con buena respuesta

### 3.2.- Biomarcadores genéticos de respuesta

Se estima que el componente genético puede explicar entre el 20 y el 95% de la variabilidad en la respuesta a fármacos. A pesar de que muchos factores no genéticos influyen en el mecanismo de acción de los fármacos, incluyendo la edad, la función del órgano, los tratamientos concomitantes, las interacciones medicamentosas y la naturaleza de la propia enfermedad, existen en la actualidad numerosos ejemplos en los que las diferencias interindividuales a un determinado fármaco se deben a variaciones en la secuencia de los genes que codifican a proteínas que pueden afectar la biodisponibilidad (i.e. metabolismo y transporte) o el mecanismo de acción de los fármacos (i.e. receptores) <sup>(269)</sup>.

El interés de los estudios farmacogenéticos en la respuesta a fármacos de acción anti-TNF $\alpha$  centra su atención en los genes que confieren susceptibilidad para desarrollar la AR y en los genes implicados en la producción o en las diferentes vías de señalización del TNF $\alpha$  <sup>(270,271)</sup>.

#### 3.2.1.- Polimorfismos del gen *TNFA*

Se ha sugerido que las variaciones genéticas en la región promotora y codificante del gen del *TNFA* podrían modular la magnitud de la respuesta secretora de este gen, por lo que los *loci* de la vía del TNF $\alpha$  son candidatos obvios que podrían influir en la respuesta al tratamiento con los inhibidores del TNF $\alpha$ .

Se han identificado diversos polimorfismos en el gen *TNFA*. El polimorfismo en la posición -308 (rs1800629) es el polimorfismo más ampliamente estudiado. Se ha observado que el genotipo -308 G/A está asociado con una mayor producción de TNF $\alpha$  e incrementa la susceptibilidad y la gravedad de la AR con respecto al genotipo G/G <sup>(272,273)</sup>. En concreto, en un estudio realizado en pacientes mexicanos con AR se objetivó una mayor frecuencia del alelo A en la posición -308 en pacientes con AR grave, en comparación con los pacientes con AR menos grave y controles sanos <sup>(274)</sup>. Así mismo, en otro estudio se observó una asociación entre el polimorfismo en la posición -308 y el daño radiográfico <sup>(275)</sup>.

Este polimorfismo también ha sido estudiado como posible predictor de respuesta al tratamiento con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$ . En el estudio de Padjukov et al <sup>(276)</sup> se incluyeron 123 pacientes tratados con ETA y se valoró la respuesta ACR20 y el índice DAS28 a las 12 semanas y su asociación con los polimorfismos ubicados en el gen *TNFA* (-308 TNFA), en el gen *IL10*, (-1087 IL10), en el gen *TGF  $\beta$ 1* (*Transforming Growth Factor*) y en el gen *IL1RN* (*Interleukin 1 Receptor Antagonist*). Ninguno de los alelos determinados estuvieron por sí solos asociados con la respuesta al tratamiento. No obstante, la combinación de ciertos alelos (-308 TNFA G/G y -1087 IL10 G/G) se objetivó que estaba asociada con una buena respuesta al tratamiento con ETA. Adicionalmente, la combinación de los alelos A2 del gen *IL1RN* y del alelo C del gen *TGF $\beta$ 1* estuvo asociada a la no respuesta terapéutica.



Cuchacovich et al<sup>(272)</sup> observaron que los pacientes con el genotipo G/G en la posición -308 del gen *TNFA* tenían mejor respuesta a las 14 semanas de tratamiento con respecto al genotipo G/A coincidiendo con los demás estudios, pero esta diferencia no se mantuvo significativa a la semana 22 de tratamiento.

En la siguiente tabla se observan los principales estudios que analizan el polimorfismo -308 del gen *TNFA* y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 12.** Estudios que evalúan la asociación del polimorfismo -308 del gen *TNFA* y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta	Conclusión
Mugnier et al, 2003	59	INF	22	EULAR	- 308 G/G se asocia a una mejor respuesta que A/A o G/A
Padjukov et al, 2003	123	ETA	12	EULAR ACR	
Cuchacovich et al, 2004	20	INF	22	ACR	- 308 G/G se asocia a una mejor respuesta que G/A a la S14 pero igual a la S22
Kang et al, 2005	70	ETA	12	ACR	-308 no se asocia con la respuesta
Cuchacovich et al, 2006	81	ADA	24	EULAR	-308 G/G se asocia a una mejor respuesta que G/A
Marotte et al, 2008	198	IFX	30	ACR	-308 no se asocia a la respuesta El alelo A está asociado a valores elevados de TNF $\alpha$ en suero
Maxwell et al, 2008	1.050	IFX/ETA	26	EULAR	-308 A/A se asocia a una peor respuesta al tratamiento con ETA No asociación con IFX

En una cohorte más numerosa se incluyeron 1.050 pacientes caucásicos (455 tratados con ETA y 450 con IFX) y se analizó que polimorfismos del *TNFA* estaban relacionados con la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Se observó que el genotipo -308 TNFA A/A estaba asociado a una pobre respuesta si lo comparamos con el genotipo G/G en pacientes que recibieron ETA. Sin embargo esta asociación no se observó entre los pacientes que recibieron IFX. Por otro lado el genotipo -238 G/A del

gen *TNFA* (rs361525) estaba asociado a una pobre respuesta en los pacientes en tratamiento con IFX pero no en los pacientes en tratamiento con ETA<sup>(277)</sup>.

Ante esta disparidad de resultados, se han realizado varios meta-análisis, que de forma esquemática se presentan en la tabla 14. El primero de ellos publicado por Lee et al<sup>(278)</sup> incluyó 6 estudios y un total de 311 pacientes tratados con IFX y ETA. Este meta-análisis concluyó que los pacientes que poseen el alelo A en la posición -308 *TNFA* tienen peor respuesta que los pacientes que tienen el alelo G.

En un segundo meta-análisis realizado por un grupo canadiense que incluyó 9 estudios con 692 pacientes con AR tratados con IFX, ETA y ADA, se observó que el alelo A en la posición -308 *TNFA* estaba asociado a una peor respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ <sup>(279)</sup>.

**Tabla 13.** Meta-análisis sobre la asociación del polimorfismo en la posición -308 del gen *TNFA* y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Referencia	N pacientes/ estudios	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta	Conclusión
Lee et al, 2006	311/6	IFX/ETA	12-100	DAS28 ACR	TNF-308 (A) es un marcador que pre- dice peor respuesta
Rielly O et al , 2009	692/9	IFX/ETA/ADA	12-30	DAS28 ACR	TNF-308 (A) es un marcador que predice peor respuesta
Pavy et al, 2010	2.579/12	IFX/ETA/ADA	12-52	DAS28	TNF-308 no es un marcador de respuesta
Lee et al, 2010	1.817/13	IFX/ETA/ADA	12-52	DAS28 ACR	TNF-308 no es marcador de respuesta TNF-238 A/G predice una peor respuesta al tratamiento con IFX

Posteriormente en el año 2010 se publicaron dos nuevos meta-análisis, el primero incluyó 12 estudios con 2.579 pacientes con AR y tratamiento anti TNF $\alpha$  y el segundo 13 estudios con un total de 1.817 pacientes. En ambos meta-análisis no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta a la terapia con anti-TNF $\alpha$  y el genotipo del polimorfismo -308 *TNFA*<sup>(280,281)</sup>.

En la actualidad se acepta que la evidencia más convincente proviene de estos dos últimos meta-análisis, ya que incluyen mayores cohortes de pacientes con AR con respecto a los meta-análisis publicados por Pavy et al <sup>(280)</sup> y Lee et al <sup>(281)</sup>. Teniendo en cuenta estos datos, actualmente no se considera al polimorfismo ubicado en la posición -308 del gen *TNFA* como un factor predictor de respuesta al tratamiento con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR <sup>(271)</sup>.

A pesar de toda esta evidencia, no podemos descartar que otros polimorfismos del gen *TNFA* diferentes al ubicado en la posición -308 puedan estar asociados con la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Existen otros polimorfismos en este gen como el situado en la posición -857 C/T o en la posición -238 A/G que demostraron estar asociados con la respuesta al tratamiento con un fármaco de acción anti-TNF $\alpha$  <sup>(282,283)</sup>.

En el estudio de Kang et al <sup>(282)</sup> también se analizó el polimorfismo -857 del gen *TNFA* y se observó una asociación con la respuesta en pacientes con AR tratados con ETA. Estos autores concluyeron que los pacientes con AR con el genotipo -857C/T del gen *TNFA* responden mejor al tratamiento con ETA que los homocigotos para el alelo C. No obstante esta asociación fue solo marginalmente significativa.

Miceli-Richard et al <sup>(283)</sup>, incluyeron 380 pacientes, un grupo de pacientes tratados con ADA en combinación con MTX y otro grupo de pacientes tratados con ADA en monoterapia. El objetivo de este estudio era evaluar la respuesta ACR50 a la semana 12 de iniciado el tratamiento. Se realizó el genotipado del gen *HLA-DRB1* y de 3 polimorfismos ubicados en el gen *TNFA* (-238A/G, -308A/G y -857C/T). Ni el número de copias del epítipo compartido en el gen *HLA-DRB1* ni el genotipo de los 3 polimorfismos del gen *TNFA* se asoció de forma significativa con la respuesta ACR50 a la semana 12 de tratamiento. Sin embargo, la construcción de haplotipos reveló que el haplotipo GGC (-238G/-308G/-857C) en la forma homocigótica, estaba presente en más de la mitad de los pacientes, y se asociaba de forma significativa con una menor respuesta ACR50 a las 12 semanas de tratamiento. Este efecto se limitó al subgrupo de pacientes tratados de forma concomitante con MTX.

Maxwell et al <sup>(277)</sup> analizó el polimorfismo del gen *TNFA* en la posición -238 A/G en un estudio que incluyó 1.050 pacientes caucásicos tratados con IFX y con ETA. En este estudio analizaron entre otros polimorfismos, el situado en la posición -238 G/A y observaron que esta variación estaba asociada a una peor respuesta en pacientes tratados con IFX pero no en pacientes tratados con ETA.

### 3.2.2.- Polimorfismos del gen *HLA-DRB1*

Debido al gran número de genes localizados en la región HLA que influyen tanto en el funcionamiento como en la regulación del sistema inmune y a la existencia del desequilibrio de ligamiento que tiene lugar en esta región son numerosos los genes que pueden influir en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR <sup>(284)</sup>.

En la tabla 15 se observan varios estudios que han investigado la influencia del EC en la respuesta terapéutica, pero la mayoría no han podido identificar una asociación con la respuesta a la terapia con inhibidores del TNF $\alpha$ . En efecto, la proporción de pacientes portadores del EC fue similar en los respondedores y en los no respondedores en pacientes con AR tratados con IFX <sup>(285,286)</sup>. Esta asociación tampoco se pudo demostrar en grupos de pacientes tratados con ETA <sup>(287)</sup> o con ADA <sup>(283)</sup>.

Sin embargo en un estudio que incluyó a 301 pacientes con AR de reciente comienzo tratados con ETA se ha observado una asociación significativa entre la respuesta al tratamiento valorada a la semana 52 y la presencia de más de una copia del epítoto compartido con respecto a los que presentaban solo una copia <sup>(288)</sup>.

**Tabla 14.** Estudios que evalúan la asociación de los polimorfismos en el gen *HLA-DRB1* con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta y remisión	Conclusión
Criswell et al, 2004 <sup>†</sup>	301	ETA	52	ACR	Pacientes con 2 copias del EC responden mejor que los que tienen 1 copia o ninguna
Martinez et al, 2004 <sup>‡</sup>	78	IFX	12	ACR	La presencia del EC no estaba asociada a la respuesta con ninguno de los anti-TNF $\alpha$ estudiados
Kang et al, 2005 <sup>†</sup>	70	ETA	12	ACR	
Marotte et al, 2008 <sup>†</sup>	198	IFX	30	ACR	
Miceli-Richard et al, 2008 <sup>†</sup>	369	ADA	12	ACR	

<sup>†</sup> **Alelos del EC:** HLA DR\*0101,\*0102,\*0401,\*0404,\*0405,\*0408,\*0413,\*1001,\*1402

<sup>‡</sup> **Alelos del EC:** HLA DR\*0101,\*0102,\*0401/9,\*0404,\*0405,\*0408,\*1001

**EC:** epítoto compartido

Con la evidencia que actualmente existe, se considera que el EC no es un marcador genético robusto para predecir la respuesta a inhibidores del TNF $\alpha$  en pacientes con AR. No obstante este marcador genético está claramente relacionado con la susceptibilidad a la AR y representa un ejemplo clásico de un biomarcador pronóstico que está estrechamente relacionado con la producción de anticuerpos anti-CCP <sup>(271, 289)</sup>.

### 3.2.3.- Otros polimorfismos genéticos

Por extensión, los alelos que confieren el riesgo para desarrollar la AR pueden ser utilizados para caracterizar pacientes en función de la respuesta a la terapia con anti-TNF $\alpha$ . Basado en esta hipótesis se han publicado estudios que centran su atención en aquellos polimorfismos asociados con la susceptibilidad a desarrollar la AR y su posible asociación con la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

Cui et al <sup>(230)</sup>, publican un estudio que incluye 1.280 pacientes procedentes de 9 cohortes diferentes de pacientes con AR, donde estudiaron 31 SNPs validados previamente como *loci* de susceptibilidad de la AR. De estos SNPs estudiados solo uno de ellos, el SNPs rs10919563 en el gen *PTPRC* (*protein tyrosine phosphatase receptor type C*) estaba relacionado de forma significativa con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  valorada en una primera etapa con respecto al  $\Delta$ DAS28 y en una segunda con la respuesta EULAR. Esta asociación fue más robusta entre pacientes con anticuerpos anti-CCP positivo o FR positivo en comparación con los pacientes seronegativos.

La asociación entre el SNPs rs10919563 en el gen *PTPRC* y la respuesta se ha podido replicar en el estudio de Plant et al <sup>(290)</sup> donde se incluyeron 1.115 pacientes procedentes de dos cohortes, la cohorte BSRBR (*The British Society for Rheumatology Biologics Register*) y la cohorte BRAGGSS (*Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate*)).

El gen *PTPRC* asociado con la respuesta en estos dos estudios fue por primera vez descrito como un gen de susceptibilidad para la AR en un meta-análisis publicado por Raychaudhuri et al <sup>(291)</sup>. El producto de este gen es un receptor transmembrana expresado en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas nucleadas. Actúa como regulador esencial de la señal del receptor de las células T y células B y es un mediador de la secreción del TNF $\alpha$  por los monocitos <sup>(230)</sup>. No obstante la importancia de este marcador en la AR aun se desconoce.

En este estudio, al igual que en el estudio de Cui et al <sup>(230)</sup> se analizaron otros genes anteriormente validados como genes de susceptibilidad a desarrollar AR. En ambos estudios solo el gen *PTPRC* demostró una asociación estadísticamente significativa con la respuesta. Los demás *loci* como el *PTPN22*, *HLADRB1*, *STAT4*, *CTLA4*, entre otros *loci* de riesgo asociados a la AR, no presentaron en estos dos estudios asociación con la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ , tanto en el análisis en relación al  $\Delta$ DAS28 como con la respuesta EULAR.

Entre los estudios de genes candidatos que analizaron otros polimorfismos destaca el estudio publicado por Potter et al.<sup>(292)</sup> donde se analizaron las muestras de ADN de 923 pacientes procedentes de la cohorte BRAGGSS para determinar si la variación genética dentro de los genes involucrados en la función del TLR (*Toll Like Receptor*) y el sistema de señalización NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*), dos vías reguladoras de la inflamación y de la respuesta inmune, contribuyen a la variación observada en la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. Fueron seleccionados 24 genes candidatos que se genotiparon en una cohorte británica de 909 pacientes con AR, tratados con IFX, ETA y ADA. Se valoró el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR (respondedores buenos y moderados vs no respondedores) a los 6 meses del inicio del tratamiento. El análisis fue realizado por subgrupos de tratamiento: ETA, IFX, IFX/ADA, y los tres fármacos combinados.

En este estudio se genotiparon y analizaron un total de 187 SNPs. De estos, 8 situados en 6 loci (*CHUK*, *IKBKB*, *MyD88*, *NF $\kappa$ B1A*, *TLR-2*, *TLR-4*) estaban asociados al  $\Delta$ DAS28. Se observó además que de estos 6 loci, 4 (*CHUK*, *IKBKB*, *MyD88*, *TLR2*) y otros 5 genes adicionales (*IRAK3*, *NF $\kappa$ B-2*, *NF $\kappa$ B1B*, *PTGS2* y *TLR-10/1/16*) demostraron una asociación significativa en relación al  $\Delta$ DAS28 y/o la respuesta EULAR. El hallazgo más robusto proviene de la asociación entre el SNP rs7744 situado en el gen *MyD88* y el SNP rs11591741 situado en el gen *CHUK* que demostraron una asociación significativa tanto en el análisis con el  $\Delta$ DAS28 como con la respuesta EULAR. Aunque este estudio utiliza un punto de corte poco robusto para definir la significación estadística, sus resultados no carecen de importancia y requieren validación en otras cohortes independientes.

Hassan et al.<sup>(293)</sup>, estudiaron un polimorfismo (rs8192284) en el gen que codifica el receptor soluble de la IL-6 (*sIL6-R*) que previamente se había asociado con las elevadas concentraciones de este receptor en población japonesa y caucásica con AR. En este estudio se incluyeron 1.050 pacientes, 455 tratados con ETA, 450 con IFX y 142 tratados con ADA. Se evaluó la asociación de este polimorfismo en relación con el  $\Delta$ DAS28 después de 6 meses de tratamiento. Sin embargo, la hipótesis de una posible asociación entre este SNP y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  no ha podido ser demostrada en este estudio.

En la siguiente tabla se observan los estudios de polimorfismos en genes candidatos analizados en relación a la respuesta con anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 15.** Estudios que evalúan la asociación de determinados polimorfismos en *loci* candidatos asociados con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

Referencia	N	Tratamiento	Duración (semanas)	Criterios de respuesta	Conclusiones sobre el -308 TNFA
Cui et al, 2010	1.283	IFX/ETA/ADA	12-48	EULAR $\Delta$ DAS28	El SNP rs10919563 (PTPRC) está asociado con una mejor respuesta
Hassan et al, 2010	1.050	IFX/ETA/ADA	24	EULAR $\Delta$ DAS28	El SNP rs8192284 (sIL-6R) no está asociado con la respuesta
Potter et al, 2011	909	IFX/ETA/ADA	24	EULAR $\Delta$ DAS28	Los SNPs rs11591741 (CHUK), rs3136645 y rs9403, (NFKB1B), rs2206593 (PTGS2), rs2289318 (TLR2) están asociados a una peor respuesta  Los SNPs rs7744 (MYD88), rs11541076 (IKBKB), rs11541076 (IRAK-3), rs11096957 (TLR-10/1/6) están asociados a una mejor respuesta
Plant et al, 2012	1.115	IFX/ETA/ADA	6	EULAR $\Delta$ DAS28	El SNP rs10919563 (PTPRC) está asociado con una mejor respuesta

## 4.- Biomarcadores genéticos identificados mediante estudios de asociación de genoma completo.

### 4.1.- Estudios de asociación de genoma completo

Los estudios de asociación genética tienen por objetivo identificar los genes relacionados con las enfermedades realizando una comparación entre la variación genética de un grupo de individuos que padecen una determinada enfermedad y un grupo control. Para llevar a cabo este objetivo existen dos tipos de estudio: los estudios que utilizan la estrategia del gen candidato y los estudios de asociación de genoma completo. En el primer tipo de estudio se analiza la variación genética en un gen cuya funcionalidad ha sido asociada a la fisiopatología de la enfermedad a estudio. En el segundo tipo de estudio no partimos del conocimiento *a priori* sino que se criba todo el genoma utilizando un gran número de marcadores. Por lo tanto son estudios que se caracterizan por no tener una hipótesis previa, sino que son estudios generadores de hipótesis, lo que constituye una ventaja de este tipo de estudios <sup>(294,295)</sup>. Para este tipo de estrategia se deberían analizar teóricamente unos 10 millones de SNPs (i.e. aproximadamente el contenido total del genoma), lo que sería muy costoso, por lo que estos estudios hacen uso de diversas estrategias.

Una de las principales estrategias de los estudio GWAS es el uso del desequilibrio de ligamento (DL) dentro del genoma. El DL es la asociación no aleatoria de alelos en el genoma y se presenta entre marcadores que están próximos en un mismo cromosoma. Por ejemplo, cuando dos marcadores están muy próximos la correlación entre sus alelos puede ser tan alta que tan sólo analizando uno de éstos es suficiente para capturar la posible asociación con la enfermedad. Esta asociación entre alelos de diferentes *loci* se puede determinar mediante diferentes estadísticos aunque el más común es el coeficiente de correlación  $r^2$ , que sirve como una medida de concordancia <sup>(295,296)</sup>.

El proyecto internacional *HapMap* ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) fue diseñado con el objetivo de identificar estos grupos de SNPs altamente correlacionados a través de todo el genoma. Para este objetivo se utilizaron tres étnias altamente diferenciadas ancestralmente: Caucásicos Europeos (90 individuos relacionados de *Utah* descendientes de Europeos (CEU)), población Africana (90 individuos *Yoruba* relacionados precedentes de *Ibadan, Nigeria* (YRI)), población Asiática (45 individuos de distintas familias procedentes de *Tokio* (JPT)) y 45 individuos no relacionados procedentes de *Beijing* (CHB) <sup>(296)</sup>.

Mediante el estudio de estas tres poblaciones muy alejadas ancestralmente el proyecto internacional *HapMap* ha podido describir los patrones de desequilibrio de ligamiento en humanos. A partir de estos patrones se pueden seleccionar SNPs altamente informativos o “*tag*” SNPs. De esta forma, con una selección adecuada de *tag*-SNPs se puede obtener con 500.000 SNPs una información muy similar a la que se obtendría si genotipáramos la totalidad de los 10 millones de SNPs. Esta estrategia ha permitido reducir enormemente los costos de genotipado y ha



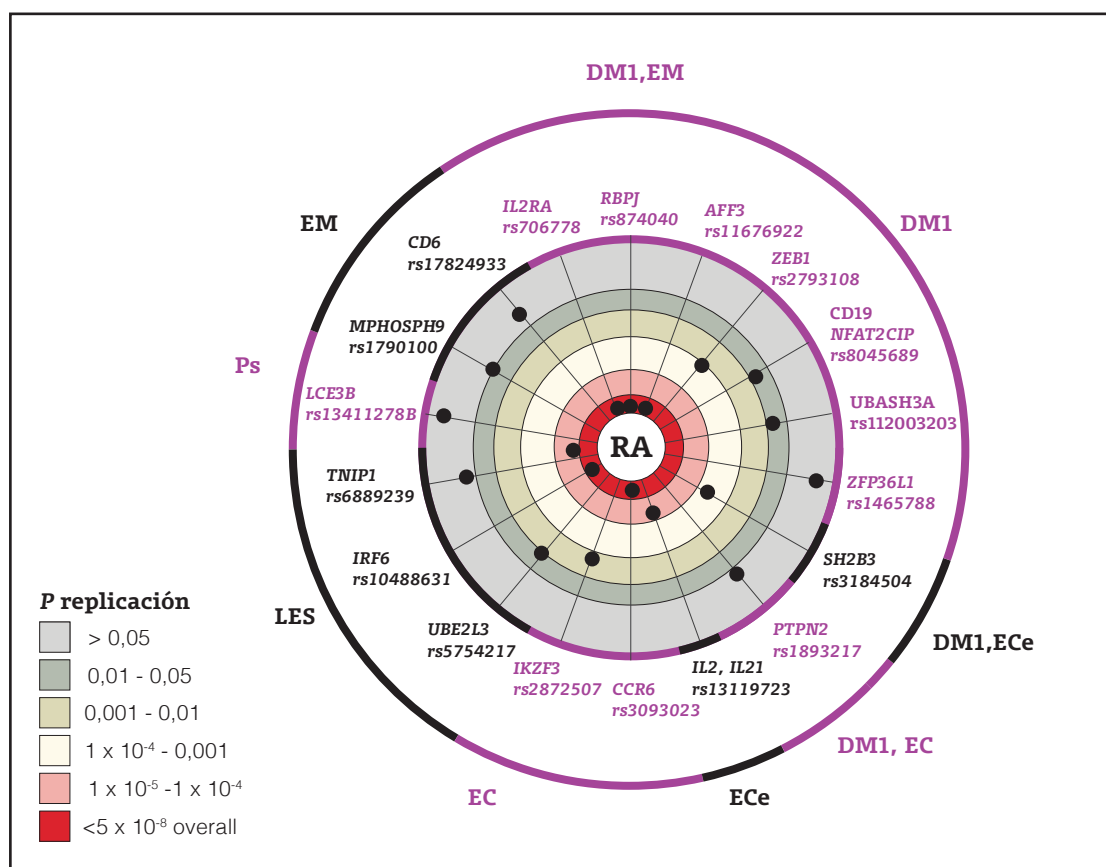
permitido el desarrollo de los estudios GWAS <sup>(296)</sup>.

En el año 2006, con el proyecto de la secuenciación del genoma humano prácticamente completo, el proyecto *HapMap* había construido una extensa base de datos de la variación dentro de los genomas de poblaciones de Europa, Asia y África. Este proyecto junto con el desarrollo tecnológico de una variedad de chip para el genotipado y la existencia de registros de poblaciones con diagnósticos mejor caracterizados han convertido a los estudios GWAS en herramientas poderosas y accesibles para el estudio de las enfermedades complejas <sup>(296, 297)</sup>.

Existen aproximadamente más de 2.000 *loci* robustamente asociados con una o más enfermedades. La mayoría de los *loci* han sido identificados en los últimos 5 años. Los estudios GWAS han sido un verdadero éxito en la identificación de los nuevos *loci* y nuevas vías que contribuyen al desarrollo de las enfermedades autoinmunes. En la actualidad, se han descrito aproximadamente 44 *loci* identificados en la colitis ulcerosa, 71 en la enfermedad de Crohn, 30 en la AR, 31 en el LES, 52 en la esclerosis múltiple, 40 en la diabetes mellitus tipo 1 y 13 en la espondilitis anquilosante <sup>(297,298)</sup>.

Estos estudios también han permitido identificar elementos genéticos comunes de predisposición a las enfermedades autoinmunes, como la existencia de regiones cromosómicas asociadas a numerosas enfermedades autoinmunes con patrones de expresión génica similares en varias de ellas <sup>(298)</sup>. Stahl et al <sup>(299)</sup> realizaron un meta-análisis que incluyó datos de 4 estudios de GWA de 5.539 pacientes con AR y 20.169 controles de origen europeo. En este estudio se seleccionaron 34 SNPs asociados con el riesgo de desarrollar AR que se replicaron en una nueva cohorte de 6.768 pacientes con AR seropositivas y 8.806 controles. De estos 34 SNPs, 18 estaban en desequilibrio de ligamento (definido como  $r^2 > 0.3$ ) con alelos de riesgo de desarrollar autoinmunidad (LES, enfermedad celiaca, enfermedad de Chron, esclerosis múltiple, psoriasis y diabetes tipo 1) validados anteriormente. Posterior a la replicación 5 SNPs fueron validados como alelos de riesgo en AR ( $P = < 5E-8$ ), 6 SNPs presentaron una asociación moderada y 6 SNPs no demostraron asociación con la AR. En el siguiente figura se observan los SNPs asociados con el riesgo de desarrollar AR identificados en este estudio y que al mismo tiempo han sido asociados con el riesgo de desarrollar otras enfermedades autoinmunes en estudios previos.

**Figura 2.** SNPs asociados con la susceptibilidad de desarrollar AR y otras enfermedades autoinmunes



**EM:** esclerosis múltiple, **DM1:** diabetes mellitus tipo 1, **Ps:** psoriasis, **EC:** enfermedad de Chron, **ECe:** enfermedad celiaca, **LES:** lupus eritematoso sistémico. Figura modificada del artículo de Stahl et al (2010).

La identificación de numerosos *loci* que predisponen a distintas enfermedades a través de los estudios de GWAS ha aumentado en los últimos años. Una revisión de más de 30 estudios genéticos realizada por Zhernakova et al<sup>(300)</sup> ha puesto de manifiesto que existen factores genéticos compartidos entre enfermedades autoinmunes lo que sugiere posibles procesos comunes etiológicos.

En algunos casos, el mismo alelo predispone a desarrollar una enfermedad autoinmune y es protector en otras. Un buen ejemplo de esto sería la región del gen *IL2RA* donde existe heterogeneidad alélica en la esclerosis múltiple y la diabetes de tipo 1. El SNP rs11594656 (A) está asociado a la susceptibilidad de desarrollar esclerosis múltiple y al mismo tiempo es protector en la diabetes tipo 1<sup>(301)</sup>.

Otros estudios han demostrado asociación de algunos *loci* de riesgo de susceptibilidad a desarrollar AR en otras IMIDs (*Immune-Mediated Inflammatory Diseases*) como el lupus eritematoso sistémico<sup>(302,303)</sup>, esclerosis sistémica<sup>(304)</sup> Síndrome de Sjögren<sup>(305)</sup>, enfermedad de Chron<sup>(306)</sup>, colitis ulcerosa<sup>(307)</sup>, enfermedad celiaca<sup>(308)</sup>, artritis psoríasis<sup>(309)</sup>, diabetes mellitus tipo 1<sup>(310)</sup>, espondilitis anquilosante<sup>(311)</sup>, artritis idiopática juvenil

<sup>(302)</sup>, enfermedades autoinmunes que afectan a la glándula tiroides <sup>(302)</sup> entre otras tal y como se observa en la tabla 16.

**Tabla 16.** *Loci* de riesgo en la AR asociados a otras enfermedades autoinmunes

IMID	Locus							
	<i>PTPN22</i>	<i>STAT4</i>	<i>CTLA4</i>	<i>HLA</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>TRAF1/C5</i>	<i>IL2RA</i>	<i>CD40</i>
EA								
EC								
ECe								
EG								
TH								
AIJ								
APs								
LES								
SJ								
ES								
DM1								
CU								

**EA:** espondilitis anquilosante, **EC:** enfermedad de Chron, **ECe:** enfermedad celiaca, **EG:** enfermedad de Graves, **TH:** tiroiditis de Hashimoto, **AIJ:** artritis idiopática juvenil, **APs:** artritis psoriásica, **LES:** lupus eritematoso sistémico, **SJ:** Síndrome de Sjögren, **ES:** esclerosis sistémica, **DM1:** diabetes mellitus tipo 1, **CU:** colitis ulcerosa. Tabla modificada del artículo de Orozco et al (2011).

Los *loci* identificados en estudios de GWAS representan objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos (i.e. polimorfismos en el gen *CTLA4*) y forman parte de vías patogénicas importantes en el desarrollo de la AR (i.e. genes de la vía de señalización de NF $\kappa$ B) <sup>(296, 297, 292)</sup>. En un periodo de menos de 5 años los estudios GWA han permitido nuevos descubrimientos sobre genes y vías implicadas en las enfermedades complejas, así como información para el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades como la AR.

#### 4.2.-Estudios de asociación de genoma completo en la Artritis Reumatoide

En el año 2005 Josephine Hoh y colaboradores realizaron el primer estudio de asociación del genoma completo que identificaba una variante de susceptibilidad asociada a una enfermedad determinada <sup>(312)</sup>. Usando la plataforma de *Affymetrix* 100K identificaron un polimorfismo ubicado en el gen del factor H del complemento que estaba asociado con la degeneración macular aguda. Esta fue la primera

prueba de que los estudios de genoma completo podrían ser utilizados para identificar variaciones genéticas relevantes asociadas a enfermedades complejas.

En el año 2007, el WTCCC (*Wellcome Trust Case Control Consortium*) publicó los resultados del estudio de asociación de genoma completo más importante realizado hasta entonces para la identificación de genes de susceptibilidad en distintas enfermedades complejas. En este estudio se identificaron diferentes polimorfismos de susceptibilidad en pacientes con 7 enfermedades complejas distintas. El estudio incluyó 3.000 controles y 2.000 pacientes en cada grupo de las distintas enfermedades, una de las cuales era la AR<sup>(313)</sup>. Para este estudio se utilizó la plataforma *Affymetrix 100 k GeneChip microarray*. En relación a la AR se observó una asociación ( $P < 5E-8$ ) entre los polimorfismos rs615672 en el gen *HLA-DRB1* ( $P = 7,5E-27$ ,  $OR = \text{No Reportado}$ ) y el rs6679677 del gen *PTPN2* (*protein tyrosine phosphatase, Non-receptor type 22*) ( $P = 5,6E-25$ ,  $OR = 1,98$ ). La asociación entre los genes *HLA-DRB1* y *PTPN22* y el riesgo de desarrollar la AR explican alrededor del 50% de la agregación familiar de la AR. En este estudio también se observó una asociación de moderada magnitud con otros 50 *loci* ( $P < 5E-4$  -  $5E-7$ ). Entre estos marcadores, los SNPs localizados en el gen *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*), *PRKCQ* (*protein kinase c, theta*), *KIF5A* (*kinesin family member 5A*), *IL2RB* (*interleukin 2 receptor, beta*) y *AFF3* (*AF4/FMR2 family, member 3*) han sido confirmados en otras cohortes independientes<sup>(313)</sup>.

Desde el estudio realizado por el WTCCC se han utilizado varias estrategias para identificar *loci* de riesgo en la AR. Estas estrategias incluyen evidentemente, otros estudios de GWAS, meta-análisis y nuevos estudios de gen candidatos.

El primer GWAS en pacientes con AR realizado en los USA y publicado por Plengue et al<sup>(314)</sup>, incluyó 397 pacientes y 1.211 controles. En este estudio se observó que el alelo menor del SNP rs10499194 era un factor protector para la AR. Este SNP está ubicado a 150 kb del gen *TNFAIP3* y *OLIG3* (*oligodendrocyte transcription factor 3*). En contraste con estos resultados, el alelo menor del SNPs rs6920220 ubicado en la misma región, fue identificado en el estudio de WTCCC como un factor de riesgo a desarrollar AR. Esta discrepancia entre estos marcadores en el gen *TNFAIP3* ilustran la complejidad de este *loci* que es considerado como el tercer *loci* más robustamente asociado a la AR después del *HLA-DRB1* y el *PTPN22*.

El segundo GWAS en pacientes con AR, también publicado por Plenge et al<sup>(315)</sup> incluía 1.522 pacientes con AR y 1.850 sujetos control. En este estudio observaron que el SNP rs3761847 situado en la región intergénica, próxima a dos genes *TRAF1* (*encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 1*) y *C5* (*encoding complement component 5*) estaba asociado con el aumento del riesgo de desarrollar AR en pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos. El riesgo de desarrollar AR aumenta un 30% en pacientes heterocigotos y un 87% en los pacientes homocigotos para este polimorfismo.

En el año 2008 el grupo de Marsal y colaboradores<sup>(316)</sup> publicó los resultados del tercer GWAS y el primero en España para determinar genes de susceptibilidad en la AR. En este estudio se incluyó una cohorte de 400 pacientes con AR de origen español y 400 sujetos hipernormales. A partir de esta estrategia se pudo identificar una nueva asociación significativa ( $P=6,53E-06$ ), entre el alelo A del SNP rs1324913 situado en el gen *KLF12* (*krueppel-like factor 12*) y la AR. En este estudio el alelo A fue un factor de protección para desarrollar la AR. Estos resultados fueron replicados por este grupo en una cohorte independiente de 410 pacientes con AR y 394 sujetos control, confirmando esta asociación ( $P=0,01$ , OR= 0,73). No obstante meses después el grupo de A. Barton realizó un estudio de replicación en una cohorte británica de 3.962 pacientes con AR, no observando asociación entre dicho gen y la AR<sup>(317)</sup>. Recientemente García-Bermúdez et al<sup>(318)</sup> realizaron un estudio de replicación de este *locus* que incluyó una cohorte española de 1.360 pacientes con AR y una danesa de 1.018 pacientes. En este estudio tampoco se observó una asociación entre este *locus* y la susceptibilidad de desarrollar AR. No obstante considerando la importancia de este gen en la patogenia de otras patologías autoinmunes, las diferencias entre las poblacionales y la variación fenotípica de los pacientes incluidos en los tres estudios, no se puede descartar una posible asociación de este *locus* con la AR.

Por su parte, Remmers et al<sup>(319)</sup> realizaron el análisis de diferentes SNPs localizados en una región del cromosoma 2 que contiene aproximadamente 13 genes candidatos previamente identificados como asociados tanto a la AR como al lupus eritematoso sistémico (LES). En este estudio se incluyó a más de 1.620 pacientes con diagnóstico de AR y 2.635 controles y se observó que el alelo menor del SNP rs7574865 del gen *STAT4* (*signal transducer and activator of transcription 4*) estaba asociado con la susceptibilidad de desarrollar AR y LES. Los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo en comparación con la ausencia de dicho alelo tenían más del doble de riesgo de desarrollar LES y un 60% más de riesgo para desarrollar AR.

Posteriormente Raychaudhuri et al<sup>(320)</sup>, publican un meta-análisis que incluyó 3.393 casos de AR y 12.462 controles procedentes del estudio de GWAS del WTCCC y de otras dos cohortes: EIRA (*Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*) y NARAC (*North American Rheumatoid Arthritis Consortium*). Como resultado del meta-análisis se seleccionaron 31 SNPs previamente no asociados con el riesgo de desarrollar AR. Estos SNPs fueron replicados en una cohorte independiente de 3.929 pacientes con AR con anticuerpos anti-CCP positivo y en 5.807 controles. En este meta-análisis se observó que el SNP rs4810485 situado en el *locus* *CD40* (*CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5*) y el SNP rs2812378 situado en el *locus* *CCL21* (*Chemokine (C-C motif) ligand 21*) presentaron una asociación de forma significativa. Adicionalmente se identificó una evidente asociación con SNPs de 4 genes adicionales, no asociados anteriormente con la AR, el SNP rs3890745 en el gen *MMEL1* (*membrane metallo-endopeptidase-like 1*), el SNP rs42041 situado en el gen *CDK6* (*cyclin-dependent kinase 6*), el SNP rs4750316 en el gen *PRKCQ* (*protein kinase C*) y el SNP rs1678542 situado en el gen *KIF5A* (*kinesin family member 5A*) no asociados anteriormente con la AR.

Al año siguiente Raychaudhuri et al <sup>(291)</sup> publican otro metanálisis en el que se incluyeron 370 SNPs de 179 *loci* diferentes que presentaron en el meta-análisis anterior una significación de  $P < 0,001$ . Se excluyeron los *loci* validados previamente y se utilizó un programa denominando GRAIL (*Gene Relationship Across Implicated Loci*), para estudiar los 179 *loci* según su asociación funcional con la AR. Los SNPs con significancia seleccionados con esta metodología fueron nuevamente replicados en una cohorte independiente de 7.957 casos y 11.958 controles. En el estudio de replicación se observó una fuerte asociación ( $P < 5E-8$ ) con los SNPs rs1980422 (*CD28 (CD28 molecule)*), rs548234 (*PRDM1 (PR domain containing 1, with ZNF doMain)*) y rs11586238 (*CD2/CD58*) con la AR y una posible asociación ( $P > 5E-8$  y  $< 5E-5$ ) con los SNPs rs394581 del gen *TAGAP (T-cell activation Rho GTPase-activating protein)*, rs10919563 del gen *PTPRC*, rs540386 del gen *TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase)* y rs12746613 del gen *FCGR2A (FC fragment of IgG, low affinity IIa, receptor)*.

Stahl et al <sup>(299)</sup> realizan un meta-análisis que incluyó 5.539 pacientes con AR con anticuerpos positivos y 20.169 controles de ascendencia europea, seguidos por una replicación independiente en una muestra de 6.768 casos de AR y 8.806 controles. Una vez excluidos los SNPs asociados previamente, se seleccionaron 11 SNPs con un valor de  $P < 10E-6$ , 9 SNPs con  $P < 10E-4$  que habían sido relacionados funcionalmente con la AR y 14 SNPs con  $p < 0,01$  asociados previamente con otras enfermedades autoinmunes. De los 34 SNPs seleccionados para el estudio de replicación, se identificaron 7 nuevos alelos de riesgo de desarrollar AR con una significancia de  $P < 5E-8$ . Los SNPs asociados con el riesgo de desarrollar AR están cercanos a genes con una conocida función en el sistema inmunitario, incluyendo los genes: *IL6ST (interleukin 6 signal transducer)*, *SPRED2 (sprouty-related, EVH1 domain containing 2)*, *RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region)*, *CCR6 (chemokine (C-C motif) receptor 6)*, *IRF5 (interferon regulatory factor 5)* y *PXK (PX domain containing serine/threonine kinase)*.

Gregersen et al <sup>(322)</sup>, llevaron a cabo un estudio de GWAS que incluyó a 2.418 pacientes y 4.504 controles. En este estudio se identificó una asociación entre el SNP rs13017599 en el gen *REL (v-REL reticuloendotheliosis viral oncogene homolog)* con el riesgo de desarrollar AR. Posteriormente este gen fue replicado en una cohorte de 2.604 casos y 2.882 controles confirmando dicha asociación. En el estudio de Gregersen et al, además se confirma la asociación con el SNP rs231735 del gen *CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)* y del SNP rs2736340 del gen *BLK (B lymphoid tyrosine kinase)*.

En el año 2010 el grupo de Paul Emery realizó un estudio de replicación de 5 genes de susceptibilidad de desarrollar AR identificados en el estudio del WTCCC (*HLA-DRB1*, *PTPN22*, *OLIG3/TNFAIP3*, *STAT4* y *TRAF1/C5*). Este estudio incluyó a 1.046 pacientes con AR y 5.968 controles procedentes del registro YEAR (*The Yorkshire Early Arthritis Register*). En este estudio se confirmó la asociación con los *loci* *PTPN22* (rs2476601), *OLIG3/TNFAIP3* (rs6920220), *STAT4* (rs7574865) y *TRAF1/C5* (rs10760130) y el riesgo de desarrollar AR sobre todo en pacientes con anticuerpos positivos (FR y/o anti-CCP positivos) <sup>(323)</sup>.

Actualmente existen aproximadamente 35 *loci* identificados que confieren riesgo a desarrollar la AR. No obstante el efecto observado habitualmente es moderado, con OR típicamente entre 1,1 y 1,8. Además la mayor parte de estos genes identificados no son exclusivos de la AR sino que tal y como lo hemos comentado anteriormente pueden estar asociados a más de una enfermedad autoinmune<sup>(217)</sup>.

A continuación se resumen en la tabla 17 los estudios de GWAS y los estudios de replicación de *loci* de susceptibilidad identificados mediante los estudios de asociación de genoma completo.

**Tabla 17.** Principales estudios que identifican *loci* de susceptibilidad en pacientes con AR

Referencia	N	Tipo de estudio	Gen	SNP	P	OR
WTCCC, 2007	1.860	GWAS	HLA-DRB1	rs9270986	8,0E-27	ND
			PTPN22	rs6679677	6,0E-25	1,98
Plenge et al, 2007	397	GWAS	OLIG3 TNFAIP3	rs10499194	1,0E-09	1,33
Plenge et al, 2007	1.522	GWAS	TRAF1-C5	rs3761847	4,0E-14	1,32
Remmers et al, 2007	1.620	Replicación	STAT4	rs7574865	2,81E-07	1,32
Thomson et al, 2007	5.063	Replicación	OLIG3 TNFAIP3	rs6920220	1,1E-08	1,23
Julia et al, 2008	400	GWAS	KLF12	rs1324913	6,53E-06	0,58
Raychaudhuri et al, 2008	3.393	Meta-análisis	CCL21,	rs2812378	6,9E-5	1,13
			CD40	rs4810485	2,4E-07	0,83
			MMEL1- TNFRSF14	rs3890745	4,3E-06	0,86
			CDK6	rs42041	5,5E-05	1,15
			PRKCQ	rs4750316	9,9E-05	0,86
Raychaudhuri et al, 2009	3.393	Meta-análisis	CD2/CD58	rs11586238	2,0E-04	1,14
			CD28	rs1980422	4,2E-05	1,16
			FCGR2A	rs12746613	9,1E-04	1,16
			PRDM1	rs548234	3,4E-04	1,12
			PTPRC	rs10919563	3,8E-04	0,84
			TAGAP	rs394581	5,6E-04	0,89
Stahl et al, 2010	5.539	Meta-análisis	TRAF6/RAG1	rs540386	6,1E-04	0,86
			IL6ST	rs6859219	2,5E-09	0,78
			SPRED2	rs934734	3,2E-07	1,13
			C5orf30	rs26232	4,3E-07	0,88
			PXK	rs13315591	3,7E-07	1,29
			RBPJ	rs874040	1,9E-07	1,14
			CCR6	rs3093023	3,3E-07	1,13
Gregersen et al, 2010	2.418	GWAS	IRF5	rs10488631	2,8E-06	1,19
			BLK	rs2736340	6,06E-07	1,23
			CTLA4	rs231735	8,24E-05	0,86
Morgan et al, 2010	1.046	Replicación	REL	rs13031237	6,01E-10	1,26
			PTPN22	rs2476601	1,0E-04	1,5
			OLIG3/TNFAIP3	rs6920220	9,0E-04	1,2
			STAT4	rs7574865	4,8E-02	1,2
			TRAF1/C5	rs10760130	3,5E-02	1,1
HLA-DRB1*01	1 copia del EC	1,0E-04	2,1			

ND: no disponible

### 4.3. Estudios de asociación de genoma completo y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$

En la actualidad existen tres estudios GWAS publicados que analizan la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta al tratamiento con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$ . El primero publicado por Liu et al en el año 2008 que incluyó 89 pacientes con AR procedentes de la cohorte ABCoN (*Autoimmune Biomarkers Collaborative Network*), el segundo publicado por Plant et al en el año 2010 que incluyó 566 pacientes con AR procedentes de la cohorte BSRBR y el tercero publicado por Krintel et al que incluyó 196 pacientes procedentes del registro DANBIO (*A Nationwide registry of BIOlogical therapies in Denmark*) que comentaremos a continuación con detalle.

#### GWAS publicado por Liu et al

Con el objetivo de identificar biomarcadores que influyen en la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$ , la ABCoN formó una cohorte de pacientes con AR que habían iniciado tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Liu et al<sup>(324)</sup> utilizaron 89 pacientes de esta cohorte para realizar un primer estudio de asociación de genoma completo con el fin de identificar variaciones genéticas comunes que podrían ser responsables de la diferencia en la respuesta al tratamiento con IFX, ETA y ADA.

Las características de la cohorte estudiada se describen a continuación. El valor de la media de la edad y del tiempo de duración de la AR de los pacientes al principio del tratamiento fue  $47 \pm 15$  años y  $8 \pm 9$  años respectivamente, 75 % de los pacientes eran de género femenino y 15% de los pacientes eran fumadores activos. Entre las variables serológicas y clínicas, el 61,9% de los pacientes tenía los anticuerpos anti-CCP positivos y el 83,7% de los pacientes tenía el FR positivo. La media del valor del DAS28 a la semana basal fue de  $5,2 \pm 0,80$ . El tratamiento de elección en estos pacientes, fue con mayor frecuencia el ETA, seguido por el IFX y el ADA. De los 89 pacientes, 7 fueron tratados previamente con otros anti-TNF $\alpha$ .

Este estudio se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizó el análisis de todos los SNPs genotipados con la plataforma *Illumina* mediante el chip *Illumina* HAP300 y se analizó su asociación en relación con el *re*/DAS28 entre la semana basal y la semana 14 del inicio del tratamiento. En esta fase se seleccionaron, aquellos SNPs con un valor de *P* corregida  $>5E-02$  y aquellos SNPs con una significancia intermedia (*P* corregida  $>5E-02$  y  $<1E-01$ ) en relación al *re*/DAS28. Con esta estrategia se identificaron 16 SNPs potencialmente asociados con el *re*/DAS28 a las 14 semanas de tratamiento.

En la segunda etapa se realizó un análisis de regresión logística y estos SNPs seleccionados previamente se analizaron en relación a la respuesta EULAR. Los pacientes se clasificaron en buenos respondedores y no respondedores.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos en las dos etapas de este estudio.



**Tabla 18.** *Loci* candidatos obtenidos en el estudio de Liu et al

SNP	Cr	Genes	Alelo de riesgo (FA)	P/ReIDAS28 <sup>a</sup>	P/ReIDAS28 <sup>b</sup>	P/EULAR <sup>c</sup>	OR <sup>d</sup> (IC 95%)
rs983332	1	LMO4	A (0,21)	5,00E-06	8,00E-03	7,00E-05	10,2 (2,6-59,2)
rs928655	1	GBP6	A (0,77)	3,00E-05	7,00E-02	9,00E-04	5,5 (1,8-20,2)
rs13393173	2	LASS6	A (0,12)	4,00E-06	2,00E-02	4,00E-03	6,8 (1,7-40,3)
rs437943	4	CENTD1	G (0,33)	4,00E-06	1,00E-01	7,00E-04	4,6 (1,8-12,3)
rs10945919	6	QK1	G (0,32)	3,00E-07	4,00E-03	7,00E-04	4,6 (1,8-12,3)
rs854555	7	PON1	A (0,34)	2,00E-06	3,00E-02	6,00E-04	4,6 (1,8-12,3)
rs854548	7	PON1	A (0,27)	3,00E-06	6,00E-02	4,00E-05	8,5 (2,6-36,5)
rs854547	7	PON1	G (0,63)	6,00E-05	1,00E-01	3,00E-03	3,6 (1,5-9,3)
rs7046653	9	IFNK	A (0,26)	5,00E-07	1,00E-02	4,00E-04	4,9 (1,8-14,0)
rs868856	9	MOBKL2B	T (0,26)	5,00E-07	1,00E-02	5,00E-04	4,9 (1,8-14,0)
rs774359	9	C9orf72	C (0,22)	6,00E-07	1,00E-02	5,00E-04	5,4 (1,9-17,3)
rs2814707	9	MOBKL2B	A (0,22)	2,00E-06	4,00E-02	6,00E-04	5,2 (2,8-16,7)
rs3849942	9	C9orf72	A (0,21)	5,00E-06	7,00E-02	1,00E-03	5,0 (1,7-15,8)
rs6028945	20	MAFB	T (0,12)	2,00E-07	3,00E-03	4,00E-04	11,2 (2,3-108,1)
rs6138150	20	CST5	T (0,84)	3,00E-06	5,00E-02	2,00E-04	11,1 (2,5-103,3)
rs6071980	20	MAFB	C (0,13)	3,00E-06	5,00E-02	9,00E-04	7,6 (1,9-44,6)

<sup>a</sup>P obtenida del análisis del ReIDAS28 como variable continua, <sup>b</sup>P ajustada por el test de permutación, <sup>c</sup>P no ajustada, <sup>d</sup>OR, No respondedor, **FA**: Frecuencia Alélica

De los 16 SNPs asociados con la respuesta al tratamiento, 4 están situados dentro de genes (*GBP6*, *LASS6*, *PON1*, *MOBKL2B*), 1 SNP está situado en el extremo no traducido 3' UTR del gen *C9orf72* y 11 en las regiones intergénicas, próximos a 9 genes (*LMO4*, *CENTD1*, *QK1*, *PON1*, *IFNK*, *MOBKL2B*, *C9orf72*, *MAFB*, *CST5*). Entre los 11 *loci* identificados tres *loci* tienen una función establecida en el sistema inmune. Uno de ellos es el gen *MAFB* (*v-mav musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen homolog B*) situado en el cromosoma 20. Este gen tiene un papel clave en la monoipoiesis y en la diferenciación de las células monocíticas y dendríticas. El otro gen identificado es el gen *PON1* (*paroxinase1*) localizado en la región del cromosoma 9 que regula la producción del IFN $\kappa$  (*interferón kappa*), que es una citoquina importante en la cascada inflamatoria<sup>(324)</sup>. El tercer SNPs, situado en el locus *IFNK* es el candidato más convincente por su marcada implicación en la inflamación.

En este estudio se llevó a cabo además la replicación de los cuatro SNPs que anteriormente habían sido asociados con la respuesta al anti-TNF $\alpha$ : rs1800896 en el gen *IL10*, rs419598 en *IL1RN* (*interleukin 1 receptor antagonist*), rs1041981 en *LTA* (*lymphotoxin alpha*), y rs4149570 en *TNFRSF1A* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*) objetivando solo una asociación significativa con el polimorfismo de la *IL-10* ( $P=1,83E-02$ )<sup>(324)</sup>.

## GWAS publicado por Plant et al

En el año 2010 se publicó otro estudio de GWAS por el grupo de Plant et al<sup>(325)</sup>. Este estudio incluyó pacientes de la cohorte del registro BSRBR de origen caucásico. Para el estudio de GWAS se incluyeron 566 pacientes tratados principalmente con IFX, y en menor porcentaje pacientes tratados por ETA y ADA. Los pacientes eran de predominio de género femenino con un valor de la media de la edad y de los años de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento de  $58 \pm 11$  años y  $14 \pm 10$  años respectivamente. El 17% de los pacientes eran fumadores y el valor de la media del DAS28 a la semana basal era  $6,7 \pm 0,9$ . En este estudio se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 10 \text{ E-}03$ .

Este estudio fue realizado en tres etapas. En la primera etapa o etapa de descubrimiento se utilizaron datos de 566 pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$ . El genotipado fue realizado utilizando la plataforma *Affymetrix GeneChip 500K Mapping Array*. En esta etapa se realizó un análisis de asociación cuantitativo entre todos los SNPs y el  $\Delta$ DAS28 a los 6 meses de iniciado el tratamiento. Se identificaron 183 SNPs asociados a la respuesta con un valor de  $P < 0,05$ . Estos SNPs fueron seleccionados e incluidos en la segunda etapa que consistió en la replicación de estos SNPs en una cohorte independiente de 410 pacientes con AR. En esta segunda etapa 12 SNPs fueron excluidos por defectos en el genotipado. Los SNPs de la etapa de descubrimiento y los de la 2° etapa de validación fueron incluidos en un meta-análisis. De este meta-análisis 10 SNPs presentaban una asociación estadísticamente significativa con el  $\Delta$ DAS28.

En la tercera etapa, los 10 SNPs que resultaron asociados con el  $\Delta$ DAS28 fueron replicados en una nueva cohorte independiente de 341 pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$ . Los SNPs resultantes de las tres etapas (1° etapa de descubrimiento, 2° etapa de replicación y 1° meta-análisis y 3° etapa de replicación) fueron incluidos en un segundo meta-análisis. Tras este meta-análisis 7 nuevos *loci* no identificados previamente en otros estudios presentaron una asociación con el  $\Delta$ DAS28 estadísticamente significativa<sup>(325)</sup>.

En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos en las tres etapas de este estudio.

De los 7 SNPs seleccionados, dos están situados en *loci* con una posible relación funcional con la AR. El SNP rs1532269 que está ubicado en el gen *PDZD2* (*PDZ Domain containing 2*) a su vez localizado en el cromosoma 5, está relacionado con la secreción de la insulina en modelos animales y puede proporcionar una base genética para explicar la relación entre la secreción de insulina y la actividad inflamatoria de la AR. El segundo SNP es el rs17301249 situado en el gen *EYA4* (*EYes Absent homolog 4*). Este gen está localizado en el cromosoma 6q23.2 y está relacionado con la expresión del IFN $\beta$  (*Interferón  $\beta$* ) y la quimioquina CXCL10 (*C-X-C motif chemokine 10*)<sup>(326)</sup>.

**Tabla 19.** *Loci* candidatos obtenidos en el estudio de Plant et al

SNP	Cr	Genes	P/1° Etapa <sup>a</sup>	P/2° Etapa <sup>b</sup>	P/1° MT <sup>c</sup>	P/3° Etapa <sup>d</sup>	P/ 2° MT <sup>e</sup>	CF <sup>f</sup>
rs12081765	1	LMX1A	7,52E-04	6,17E-02	1,47E-04	7,12E-01	7,39E-04	0,18
rs1532269	5	PDZD2	7,11E-04	7,85E-02	1,85E-04	7,01E-01	7,37E-04	0,20
rs17301249	6	EYA4	3,37E-04	4,51E-02	5,17E-05	2,61E-01	5,67E-05	-0,27
rs7305646	12	LOC387845	9,16E-04	4,91E-02	1,25E-04	2,92E-01	1,47E-04	-0,21
rs4694890	4	TEC	7,09E-04	4,36E-02	9,95E-05	3,45E-01	6,47E-03	-0,15
rs1350948	11	LOC196188	8,65E-04	4,08E-02	1,01E-04	2,29E-01	4,64E-03	0,19
rs7962316	12	MRPL42	5,09E-04	8,60E-02	1,64E-04	1,51E-01	2,05E-02	0,13

<sup>a</sup>P resultante de la primera etapa o etapa de descubrimiento, <sup>b</sup>P resultante de la 1° replicación, <sup>c</sup>P resultante del meta-análisis (MT) de la 2° etapa <sup>d</sup>P resultante de la 2° replicación, <sup>e</sup>P resultante del 2° MT de la tercera etapa. <sup>f</sup>CF=coeficiente final

## GWAS publicado por Krintel et al

En el año 2012 se publicó un estudio de GWAS que incluía 196 pacientes de la cohorte DANBIO con el diagnóstico de AR tratados con anti-TNF $\alpha$ . En este estudio un total de 561.466 SNPs fueron genotipados utilizando el chip de *Illumina Human-Hap550K duo array*.<sup>(270)</sup>

Para identificar los SNPs asociados a la respuesta terapéutica se utilizaron tres modelos. Dos de ellos fueron modelos lineales considerando el  $\Delta$ DAS28 y el *re*/DAS28 a la semana 14 de tratamiento ajustando ambos modelos por el DAS28 a la semana basal. El tercer modelo analizó los SNPs asociados con la respuesta EULAR. Los pacientes se clasificaron en buenos respondedores y malos respondedores según los criterios de respuesta EULAR. En este último análisis no se realizó la corrección por ninguna covariante.

En este estudio se incluyeron 196 pacientes con AR. De estos el 80% de los pacientes eran de género femenino, con un valor de la media de la edad y del tiempo de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento de  $45 \pm 16$  y  $11 \pm 11$  años respectivamente. El 33 % de los pacientes eran fumadores activos. En relación a los autoanticuerpos el 59% y el 63% eran pacientes con anticuerpos anti-CCP y FR positivo, respectivamente. El tratamiento utilizado en la mayoría de los pacientes era el IFX y en menor porcentaje ADA y ETA.

En este estudio ningún SNPs alcanzó la significancia para un estudio de GWAS ( $P < 5E-8$ ) sin embargo en los tres modelos se observaron SNPs asociados a la respuesta con valores de *P* entre  $5,0E-4$  y  $5,0E-7$ , tal y como se observa en la tabla 20.

Los SNPs situados en la región 50-UTR (*untranslated región*) del gen *ALPL* (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney) estuvieron asociados con el  $\Delta$ DAS28 y el *re*-DAS28, pero no con la respuesta EULAR a la semana 14 de tratamiento. Lo mismo

se observó con diferentes SNPs localizados en regiones no codificantes alrededor del gen *TLR4* (*toll-like receptor 4*) y del gen *DBC1* (*deleted in bladder cancer 1*) que estuvieron asociados con el  $\Delta$ DAS28 y el *re*/DAS28 pero no con la respuesta EULAR. Ningún SNP asociado con la respuesta EULAR coincidía con los SNPs identificados en los otros modelos.

**Tabla 20.** Loci candidatos obtenidos en el estudio de Krintel et al

SNP	Cr	Genes	MAF	P/DAS28 <sup>1</sup>	P/EULAR	OR* IC 95%
rs10520789	15	<i>NR2F2</i>	0,11	5,64E-07	-	-
rs16973982	15	<i>NR2F2</i>	0,11	2,79E-06	-	-
rs11870477	17	<i>MAP2K6</i>	0,15	3,30E-06	-	-
rs885814	1	<i>ALPL</i>	0,32	5,52E-06	-	-
rs885813	1	<i>ALPL</i>	0,46	9,99E-06	-	-
rs8046065	16	<i>CREBBP</i>	0,014	1,43E-05	-	-
rs869179	1	<i>ALPL</i>	0,37	1,81E-05	-	-
rs1875620	9	<i>C9orf47</i>	0,45	1,90E-05	-	-
rs11525966	9	<i>C9orf47</i>	0,45	1,90E-05	-	-
rs2722824	9	<i>TLR4</i>	0,21	1,93E-05	-	-
<b>P/DAS28 <sup>2</sup></b>						
rs1539909	18	<i>CBLN2</i>	0,09	4,13E-06	-	-
rs960902	2	<i>QPCT</i>	0,50	8,02E-06	-	-
rs17679567	16	<i>CNTNAP4</i>	0,25	9,04E-06	-	-
rs4412918	15	<i>PRTG</i>	0,21	1,76E-05	-	-
rs11124586	2	<i>QPCT</i>	0,45	2,03E-05	-	-
rs7816916	8	<i>HAS2AS</i>	0,49	2,73E-05	-	-
rs10760019	9	<i>DBC1</i>	0,39	2,94E-05	-	-
rs884559	9	<i>NACC2</i>	0,30	2,95E-05	-	-
rs1827596	2	<i>CNTNAP5</i>	0,17	3,04E-05	-	-
rs885814	1	<i>ALPL</i>	0,32	3,59E-05	-	-
rs11045392	12	<i>PDE3A</i>	0,34	-	1,70E-06	3,3 (1,9-5,6)
rs3794271	12	<i>SLCO1C1</i>	0,35	-	3,50E-06	3,2 (1,9-5,5)
rs717117	11	<i>LRRC55</i>	0,11	-	9,60E-06	10,7 (3,1-36,2)
rs12417609	11	<i>LRRC55</i>	0,11	-	9,60E-06	10,7 (3,1-36,2)
rs12698335	7	<i>SHH</i>	0,22	-	5,50E-05	3,9 (2,1-7,5)
rs17714261	19	<i>ZNF180</i>	0,26	-	2,00E-05	0,3 (0,16-0,53)
rs9301169	13	<i>FAM155A</i>	0,27	-	2,40E-05	0,3 (0,18-0,58)
rs16911006	9	<i>ZNF618</i>	0,29	-	2,70E-05	0,3 (0,18-0,55)
rs9539845	13	<i>OR7E156P</i>	0,29	-	2,80E-05	3,1 (1,8-5,5)
rs6578820	11	<i>ZNF214</i>	0,36	-	2,80E-05	0,33 (0,2-0,56)

1. *P* resultante del análisis con respecto al  $\Delta$ DAS28, 2. *P* resultante del análisis con respecto al *re*/DAS28.

En este estudio además se identificaron polimorfismos en *loci* involucrados en vías o *pathways* con un papel importante en la función del TNF $\alpha$  y se objetivó que estas vías estaban asociadas con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. Estas vías fueron identificadas utilizando el programa GSEA (*Gene-set enrichment analysis*).

Con este programa se pudieron identificar 22 vías, algunas de ellas asociadas a la inflamación, a la apoptosis y a la respuesta inmune. Una de estas vías es la vía de señalización del TNF $\alpha$  que engloba un total de 236 genes. Esta vía controla la unión del TNF $\alpha$  con su receptor que desencadena una serie de procesos relacionados con la expresión de los genes involucrados con el crecimiento celular, la apoptosis, la oncogénesis, la respuesta inflamatoria y la respuesta al estrés. Otra vía identificada es la vía de señalización del receptor TGF $\beta$  que tiene un papel importante en la supresión de la inflamación. La vía del p38 MAPK es otra vía de gran interés identificada en este estudio ya que regula la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis<sup>(326)</sup>. La membrana sinovial de los pacientes con AR se caracteriza por una activación de MAPKs y p38  $\alpha$  presentes en las células endoteliales que tienen un papel importante en la destrucción ósea mediada por el TNF $\alpha$ .

A raíz de estos resultados, los autores de este estudio proponen la utilización de GSEA como un instrumento útil para analizar los resultados de GWAS ya que les ha permitido identificar varias vías que pueden tener un papel relevante en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

### **Estudios de replicación de SNPs asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ identificados en estudios de asociación de genoma completo.**

Los resultados del estudio de Liu et al han sido analizados en otras cohortes independientes. El primer estudio de replicación fue publicado por Suarez-Gestal et al<sup>(327)</sup>. Este estudio fue realizado con el objetivo de validar los SNPs identificados por Liu et al asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Para ello, se incluyeron 155 pacientes con AR tratados con los tres anti-TNF $\alpha$  más comercializados. En este estudio se genotiparon los 16 SNPs candidatos del estudio de Liu et al. El análisis de asociación utilizó en una primera etapa el modelo de regresión lineal para analizar la asociación de estos SNPs con el *re/DAS28* y en una segunda etapa la regresión logística para analizar la asociación con la respuesta EULAR. En este estudio no se observó asociación con la respuesta con ninguno de los 16 SNPs identificados por Liu et al. Ante la ausencia de replicación, los autores de este estudio sugieren que no existen evidencias suficientes que sustenten la hipótesis que la variación genética podría influir de forma importante en la respuesta al tratamiento con estos fármacos y que los resultados del estudio de Liu et al<sup>(324)</sup>, podrían haber estado influenciados por el pequeño tamaño de la muestra<sup>(327)</sup>.

El estudio de GWAS de Krintel et al<sup>(270)</sup> comentado anteriormente aparte de presentar los resultados obtenidos del estudio de asociación de genoma completo y el análisis de las vías génicas de regulación, presentaron un estudio de replicación

de los resultados del estudio de Liu et al y Plant et al. Utilizando un modelo de análisis similar al realizado en cada uno de los dos estudios no se pudieron validar ni los 16 SNPs publicados anteriormente por Liu et al ni los 7 SNPs publicados por Plant et al.

Hasta la fecha no ha sido posible replicar ninguno de los resultados publicados en los estudios de GWAS y respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  por lo que se precisan más estudios para confirmar o descartar estos resultados de forma convincente.

---

# OBJETIVOS

---

Los objetivos principales del presente proyecto de tesis doctoral son:

1.- Identificar nuevos biomarcadores de respuesta no genéticos al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en una gran cohorte de pacientes con artritis reumatoide.

2.- Identificar nuevos biomarcadores de respuesta genéticos al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide a partir de la estrategia de asociación de genoma completo en la segunda mayor cohorte de pacientes analizada hasta el momento.

3.- Replicar en nuestra cohorte de pacientes con artritis reumatoide aquellos loci candidatos asociados previamente a la respuesta al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .



---

# METODOLOGIA

---

## 1.-Diseño del Estudio

Estudio de asociación de genoma completo en una cohorte de pacientes con AR seleccionados del IMID-Biobank.

El IMID-Biobank es un biobanco especializado en la colección, procesamiento y almacenamiento de muestras a gran escala de pacientes con enfermedades mediadas por mecanismos inmunes (*Immune Mediated Inflammatory Diseases* o IMIDs) de referencia internacional y creado con el fin de proporcionar la estructura necesaria para el desarrollo del proyecto científico tecnológico singular y de carácter estratégico PSE "IMID-Kit".

Este proyecto de tesis doctoral se diseñó en dos etapas:

Estudio de biomarcadores no genéticos:

- Identificación de variables clínicas, epidemiológicas y serológicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.
- Replicación de variables clínicas, epidemiológicas y serológicas previamente asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

Estudio de biomarcadores genéticos:

- Identificación de nuevas regiones genómicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  mediante un estudio de asociación de genoma completo (Genome-Wide Association Study o GWAS) en pacientes con AR.
- Replicación de *loci* asociados previamente a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

## 2. Proyecto PSE “IMID-Kit”

### 2.1.- Definición, objetivos y estructura del Proyecto IMID-Kit

El proyecto PSE IMID-Kit es un proyecto de investigación biomédica financiado a través de la convocatoria “Proyectos Singulares y Estratégicos. Plan Nacional de Biotecnología” y dirigido por la Dra. Sara Marsal. El objetivo principal de este proyecto es la obtención de un kit diagnóstico robusto y económico de las enfermedades IMID. Entre los objetivos secundarios destacan la realización de un estudio de asociación de genoma completo (*Genome-Wide Association Study o GWAS*) en pacientes con AR de la población española y la creación del IMID-Biobank. Este proyecto se inició en el año 2006 y ha finalizado recientemente en el año 2011, aunque actualmente tiene su continuidad a través del Proyecto INN-PACTO financiado por la convocatoria “Plan Nacional de Investigación, desarrollo e Innovación Tecnológica, Subprograma INNPACTO”.

Las IMIDs son un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas de etiología desconocida. Son enfermedades prevalentes (5-7%, en distintas series) que afectan a un amplio sector de la población laboralmente activa<sup>(289)</sup>. Actualmente no existe un tratamiento curativo para estas enfermedades y aunque su curso se ha modificado en los últimos años, se trata de enfermedades graves, de mal pronóstico y que ocasionan una marcada discapacidad. Actualmente se considera que tienen unos mecanismos fisiopatológicos comunes, en base a unas similitudes genéticas, clínicas y terapéuticas. En el proyecto PSE IMID-Kit se han incluido muestras y datos asociados de pacientes con 6 enfermedades IMID: AR, psoriasis, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, artritis psoriasica y colitis ulcerosa, además de un grupo de sujetos control hipernormales para las enfermedades IMID.

Los estudios de asociación de genoma completo requieren para su realización un tamaño muestral importante por lo que para el correcto desarrollo de este proyecto se ha requerido un elevado e inusual esfuerzo de participación y coordinación entre distintas especialidades médicas. En total han participado más de 80 Servicios médicos de las especialidades de Reumatología, Dermatología y Gastroenterología pertenecientes a distintos Hospitales Universitarios del Servicio Nacional de Salud, coordinados todos ellos por la Dra. Sara Marsal. La distribución geográfica de todos estos centros participantes tiene como objetivo recoger muestras de pacientes e individuos sanos representativas de la población española.

En cada uno de los centros participantes un equipo de 3 personas, el propio facultativo especialista, un residente de 3º o 4º año y un ATS especializado han sido responsables de la obtención de las muestras y de los datos asociados a través de unos protocolos previamente establecidos. En total, un equipo humano de más de 250 profesionales sanitarios trabajando de forma coordinada a través de todo el estado español ha hecho posible la realización de este proyecto.

## 2.2.- IMID-Biobank

La necesidad de obtener un elevado número de muestras para alcanzar los objetivos del Proyecto Singular y Estratégico "IMID-Kit" dio lugar a la iniciativa de crear un biobanco específico para muestras procedentes de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por mecanismos inmunes: el IMID-Biobank. El IMID-Biobank fue creado por tanto, dentro del marco del proyecto PSE IMID-Kit y tiene como primer objetivo almacenar y gestionar las muestras biológicas del proyecto según un elevado estándar de calidad previamente definida.

La calidad de las muestras analizadas en cualquier proyecto de investigación es esencial para la consecución de sus objetivos y la fiabilidad de los resultados obtenidos. La planificación y el desarrollo del IMID-Biobank, contó con la colaboración del Banco Nacional de ADN (BNADN). En base a las necesidades del proyecto PSE IMID-Kit se definieron las fases del desarrollo del biobanco que comprenden desde la formación e incorporación de personal especializado en el año 2007 hasta la obtención de la Certificación de Calidad ISO 9001:2008 a principios del año 2009. Después de dos auditorias anuales de seguimiento, este sistema de gestión de calidad ha sido de nuevo recertificado en el año 2012.

La estructura del IMID-Biobank está constituido por un Director, un Coordinador Técnico o Responsable de Fichero, un Lab manager, una Unidad de Calidad, una Unidad de Gestión Económica y un cuerpo Técnico. Además, de acuerdo con lo establecido en la legislación vigente (Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre de 2011) en materia de biobancos, el IMID-Biobank está adscrito a Comités Ético y Científico externos descritos por la legislación vigente en materia de biobancos.

### Técnicas y productos resultantes

En el IMID-Biobank se procesan muestras de sangre y orina de pacientes con enfermedad IMID. A partir de la sangre se realiza la separación de plasma y de fracción celular, la extracción y normalización de DNA, la extracción de RNA y la separación y congelación de células mononucleares de sangre periférica. Los productos derivados del procesado de la sangre y de la orina son alícuotados y almacenados en las condiciones óptimas (i.e. temperatura ambiente, congelados a -80°C, criopreservados en nitrógeno líquido) según la naturaleza de los mismos.

De esta manera, en el IMID-Biobank se generan alícuotas de los siguientes productos:

- DNA
- RNA
- Plasma
- Orina
- Fracción celular
- Células congeladas para su posterior inmortalización

En relación al ADN, que es el producto derivado utilizado en los análisis que conciernen a este proyecto de tesis doctoral, cabe especificar que a partir de la sangre periférica en EDTA (ácido etilendiaminotetracético) se obtiene el ADN "madre", a una concentración variable según cada muestra. En el IMID-Biobank, estructura en la que el material debe estar organizado y almacenado de la manera más homogénea posible, se procede a la normalización del ADN que consiste en concentrarlo o diluirlo con una solución (buffer TE o agua), según sea necesario, para obtener una concentración estándar de 100ng/ $\mu$ l. La concentración inicial del ADN madre y la concentración final del ADN normalizado se valora por espectrofotometría de absorción (*ND 1000, Nanodrop Technologies*). La manipulación del ADN durante su normalización se realiza sobre una cama de hielo para mantenerlo a la temperatura adecuada.

A partir del ADN normalizado se prepara un número determinado de alícuotas con el objetivo de someter el ADN almacenado al menor número de ciclos de descongelación/congelación necesarios cada vez que se ceda una pequeña cantidad a un investigador solicitante. Concretamente se preparan hasta 6 alícuotas de 300 $\mu$ l de solución de ADN a una concentración estándar de 100ng/ $\mu$ l. La preparación de las alícuotas finales en el IMID-Biobank se realiza de manera automatizada (*Freedom Evo, Tecan*) en tubos *Micronic* de 650 $\mu$ l de capacidad, identificados en su base mediante codificación 2D. Por razones de seguridad, el número de alícuotas de DNA generadas se divide y se almacena en dos cajas precodificadas distintas, que se ubicarán en congeladores diferentes. El código de la caja y el código de cada alícuota se registran en la aplicación informática de gestión del laboratorio (BancoADN, Vitrosoft S.A. ([www.vitrosoft.com](http://www.vitrosoft.com))), de manera que esto permite mantener su trazabilidad en todo momento. Así, la aplicación registra para cada individuo y para cada tipo de muestra, la ubicación física en los almacenes de cada alícuota generada. Este sistema automatizado permite realizar el proceso de forma más exacta, con mayor calidad y en menor tiempo, con mínima intervención manual, lo que minimiza el riesgo de error del procesado.

### **2.3.- Planificación del proceso de recogida de muestras biológicas y datos asociados para el proyecto PSE IMID-Kit**

#### **Muestras de pacientes IMID**

Para hacer posible la recogida de muestras y datos asociados de los pacientes, el IMID-Biobank procedió a la elaboración de los siguientes documentos:

- **Procedimientos**

Aquellos documentos necesarios para estructurar y estandarizar el proceso de recogida en los centros colaboradores. En ellos se describe detalladamente los pasos a seguir durante todo el proceso, desde la recepción del material para la extracción hasta el envío de las muestras al BNADN y al IMID-Biobank.

- Formularios
  - Epidemiológico. Se empleó el mismo documento utilizado por el BNADN para sus propios proyectos en el que se recoge información general del donante.
  - Clínicos. Estos documentos que recogen la información del paciente relacionada con la enfermedad, se elaboraron en las comisiones clínicas específicas de cada enfermedad.

Desde el primer momento se ha mantenido una estrecha relación con los centros colaboradores. Se realizaron múltiples reuniones en las que se explicó todo el proceso de recogida de muestras y datos asociados y se les entregó la documentación necesaria. Se puso a su disposición un teléfono de contacto y varias direcciones de correo electrónico para la resolución de posibles problemas relacionados con la obtención de las muestras.

El cuestionario epidemiológico incluido en el anexo 1, elaborado por el BNADN como se comentó anteriormente, fue común para todos los individuos (pacientes IMID y controles). En el grupo de los controles, se utilizó también un segundo cuestionario específico para caracterizar su hipernormalidad. El cuestionario epidemiológico en general cuenta con 6 apartados:

- A) Datos relativos a la extracción
- B) Actividades
- C) Hábitos
- D) Cuestionario demográfico
- E) Estudios
- F) Cuestionario genealógico

En reuniones periódicas las distintas comisiones clínicas determinaron los fenotipos IMID de interés para cada una de las seis enfermedades a estudio. Para definir los criterios diagnósticos de las seis enfermedades a estudio se utilizaron los criterios actualmente recomendados por las respectivas sociedades científicas. No obstante, los dos objetivos principales en la selección de pacientes fueron incluir fenotipos clínicos bien definidos mediante variables robustas y priorizar aquellos subtipos clínicos que más se pueden beneficiar de un diagnóstico precoz.

En concreto, en los cuestionarios clínicos para cada una de las enfermedades IMID se definieron los siguientes apartados:

- A) Criterios de inclusión y exclusión
- B) Antecedentes familiares
- C) Comorbilidad
- D) Variables clínicas y biológicas (comunes y específicas de cada enfermedad)
- E) Variables relacionadas con los tratamientos previos
- F) Determinación de la actividad de la enfermedad en el momento de la extracción

El cuestionario clínico específico de la AR fue elaborado por la Comisión Clínica específica de la AR (CC-AR) que estaba constituido por reumatólogos de reconocido prestigio nacional. Tal y como se observa en el anexo 2, en este cuestionario se registran datos relacionados a las características clínicas de la AR (i.e. años de evolución de la enfermedad, criterios diagnósticos presentados), a las caracte-

rísticas biológicas (i.e. autoanticuerpos), radiográficas (i.e. número de erosiones en manos, pies), quirúrgicas (i.e. subluxación atlanto axial, prótesis) y relativos al tratamiento (i.e. terapia biológica).

### **Muestras de los sujetos controles**

En base a la estructura del proyecto PSE IMID-Kit, el Banco Nacional de ADN (BNADN) asumió la obtención de muestras de los individuos sanos, su procesado y su almacenamiento.

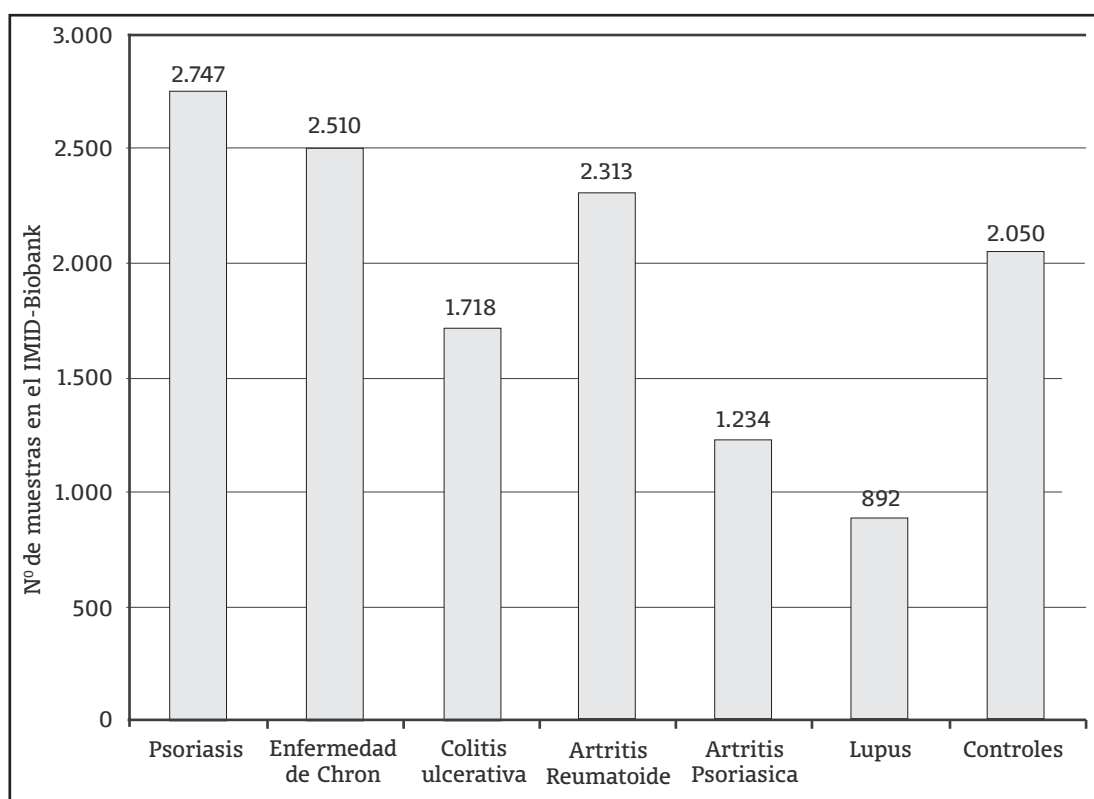
El objetivo del estudio fue la inclusión de 3.000 controles hipernormales de la población española. Este tipo de individuos control es específico para las enfermedades IMID incluidas en el proyecto y sus características fueron definidas por las distintas comisiones clínicas y el BNADN. En este sentido, la experiencia del BNADN en la obtención de controles de la población española ha sido fundamental para coordinar la red de Bancos de Sangre del estado español que han colaborado en la obtención de los sujetos control.

### **IMID-Biobank: Situación actual**

En la actualidad se han obtenido muestras biológicas y datos asociados de un total de 12.173 pacientes con enfermedades IMID (artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis psoriasica y lupus eritematoso sistémico) y de un total de 2.200 sujetos control.

En el gráfico 4 se detalla la distribución de las muestras obtenidas y almacenadas en el IMID-Biobank en el marco de los proyectos PSE IMID-Kit e INNPACTO.

**Gráfico 4.** Muestras de pacientes IMID y controles hipernormales obtenidas y almacenadas en el IMID- Biobank.



## 2.4.- Base de datos clínicos de los pacientes IMID

### Obtención de los datos clínicos

En las distintas comisiones clínicas y de forma coordinada se acordó el siguiente procedimiento para la obtención de los datos clínicos:

- La obtención e introducción de los datos clínicos asociados se realizó por el médico residente de 3er o 4º año bajo la supervisión del facultativo especialista participante
- Los datos clínicos respectivos se obtuvieron directamente de la historia clínica del paciente y fueron introducidos en la base de datos "Imid-kit" (<http://imid-kit.bsc.es>).
- Los datos clínicos de los pacientes con enfermedad de Crohn fueron introducidos directamente a la base de datos ENEIDA que bajo el auspicio de GETECCU (Grupo Español de Trabajo en Crohn y Colitis Ulcerosa) constituye un banco de datos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. El equipo *Life Since* del BSC (*Barcelona Supercomputing Center*) elaboró el *software* necesario para la transferencia de los datos clínicos de interés desde esta base de datos a la base de datos "Imid-kit".



- Los datos asociados a la determinación de la actividad de la enfermedad fueron obtenidos por el propio médico especialista e introducidos en la base de datos “Imid-kit” por el residente asignado. Estos datos se obtuvieron el mismo día de la extracción sanguínea.
- El mismo día de la extracción, un técnico asistente sanitario (ATS) cumplimentó junto con el paciente el cuestionario epidemiológico y lo remitió al IMID Biobank. Los datos incluidos en estos cuestionarios fueron introducidos a la base de datos “Imid-kit” directamente por el personal técnico del IMID BioBank.
- El personal técnico del BNADN introdujo los datos epidemiológicos y clínicos de los sujetos control directamente en la aplicación LIMS del BNADN y posteriormente fueron exportados a la base de datos “Imid-kit” para su análisis conjunto.

### **Creación y mantenimiento de la base de datos “IMID-kit”**

La creación y el mantenimiento de la base de datos estuvo a cargo del Prof. JL Gelpi (*Barcelona Supercomputing Center* – Instituto Nacional de Bioinformática).

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos para el proyecto PSE IMID-kit, fue necesario disponer, por un lado, de un entorno de trabajo en grupo que hiciera factible la interrelación de los grupos participantes en el proyecto, así como de un lugar en internet donde publicitar el proyecto y los resultados del mismo. Para ello se desarrolló un sitio web : <http://imid-kit.bsc.es>.

En el proyecto PSE IMID-kit se alcanzaron dos retos importantes, la gran cantidad de datos que se pretendía recoger y su diversidad, al provenir de seis enfermedades distintas, con gran número de campos de naturaleza específica. Por ello el proyecto se articuló hacia la generación de una base de datos fenotípica y una aplicación de gestión asociada, en la que la naturaleza de la información almacenada no fuera determinante ni de la estructura de la base de datos ni de la estructura de la aplicación asociada.

Este modelo permitió, una adaptación simple de cada uno de los formularios de datos clínicos diseñados por la comisión correspondiente y permitió la selección de casos para el análisis de un modo global e independiente de los datos. Adicionalmente, la aplicación cuenta con un sistema de seguridad que permite un acceso controlado y restringido, dada la naturaleza sensible de los datos.

En él se definen cuatro grupos principales: a) Formularios, b) Casos, c) Datos clínicos y d) Usuarios. El grupo “Formularios” recoge información sobre la naturaleza, definición y opciones particulares de los datos almacenados. El grupo “Casos” mantiene la identificación de los datos almacenados, así como la constancia de su estado (iniciado, completado por el centro responsable, o completo). Debe destacarse aquí, que para asegurar el anonimato de los datos de naturaleza clínica, no se almacena ningún dato relevante sobre la identidad de los pacientes, sino que

únicamente se mantienen las claves IMID-Kit y las claves del Banco de DNA, estas últimas necesarias para la relación con los datos genotípicos. Únicamente los centros colaboradores mantienen en su registro interno la relación entre el código IMID-Kit y los datos reales. El grupo "Datos clínicos" aloja los datos clínicos introducidos por los centros colaboradores, y finalmente el grupo "Usuarios" mantiene información sobre la "propiedad" de los datos así como los permisos de acceso a los mismos. La estructura de la base de datos permite alojar de manera directa cualquier cuestionario de datos clínicos, únicamente modificando el contenido del grupo "Formularios".

La aplicación de gestión asociada a la base de datos comentada se ha construido de acuerdo con las especificaciones siguientes:

1. Acceso restringido con diversos niveles de privilegio
2. Recogida de datos adaptada a los cuestionarios clínicos disponibles, con navegación intuitiva entre formularios
3. Búsqueda de casos incluyendo lógica de selección avanzada y posibilidad de almacenamiento de criterios y resultados de búsquedas.
4. Estadística de introducción de datos
5. Herramientas de análisis epidemiológico

## **2.5.- Pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el Proyecto PSE IMID-Kit**

La doctoranda M. Isabel Acosta bajo la supervisión de la Directora del Proyecto PSE IMID-Kit, la Dra. Sara Marsal, fue la responsable de las siguientes tareas asociadas al proyecto PSE-IMID-kit:

### **Selección e inclusión de pacientes con AR procedentes del *Hospistal Universitari Vall d'Hebron***

Se incluyeron 300 pacientes con AR procedentes de las consultas externas de Reumatología del *Hospital Universitari Vall d'Hebron* (HUVH). Un 80% de los casos fueron pacientes que realizaban un seguimiento habitual en la consulta monográfica de artritis inflamatoria crónica (AIC) de la Dra. Sara Marsal y en un porcentaje inferior de pacientes estos fueron seleccionados desde otras consultas de la Unidad de Reumatología del mismo hospital gracias a la colaboración del Dr. Xavier Sans y del Dr. Cayetano Alegre.

Este proceso se llevó a cabo en 2 fases:

- Fase I: Selección de pacientes
- Fase II: Registro de datos clínicos

En la Fase I, los pacientes fueron seleccionados en base a los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el protocolo clínico específico para la AR. La Dra. Acosta fue la responsable directa de la programación de visitas y del cumplimiento del protocolo del proyecto. Este proceso se realizó en la propia consulta externa durante una visita de seguimiento de rutina. Una vez el paciente había sido seleccionado e invitado a participar en el estudio se le programaba una visita independiente

para llevar a cabo todo el protocolo de estudio. A partir de este momento todo el proceso de inclusión de los 300 pacientes procedentes del HUVH estuvo bajo la responsabilidad de la doctorando.

Las visitas se programaron de forma periódica al inicio del estudio (i.e. aproximadamente cada dos semanas) y de forma más irregular durante el último periodo a medida que los pacientes que acudían a consultas externas ya habían sido incluidos. Este proceso se llevó a cabo entre los años 2009-2011, siendo la doctoranda residente de la especialidad de Reumatología del 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> año formativo.

La duración de cada visita fue de entre 30 a 40 minutos por paciente por lo que se limitaba a un máximo de 7 pacientes por día. Se visitaron en promedio 5 pacientes por día distribuidos en 60 visitas aproximadamente a lo largo de 2 años. Las visitas se realizaron en las consultas externas por las tardes. En casos excepcionales (i.e. paciente con dificultad para la movilización) los pacientes eran visitados el mismo día de la visita de seguimiento de Reumatología. En varias ocasiones la Dra. Acosta se puso en contacto con los pacientes por vía telefónica para confirmar la visita o reprogramarla.

El día de la extracción la doctoranda en primer lugar, procedía a la lectura detallada del consentimiento informado (CI) al paciente invitándole a participar en el proyecto. Este CI está disponible en el Anexo 3. La Dra. Acosta realizaba la consiguiente aclaración de posibles dudas que pudieran existir posterior a dicha lectura. Si el paciente accedía a participar en el proyecto, se procedía a la firma de dos copias de CI, una copia para el paciente y otra para el IMID-Biobank.

Una vez obtenido el CI, se procedía a la extracción sanguínea realizada por el ATS designado para el proyecto, bajo la supervisión de la doctoranda. Previamente se verificaba los elementos necesarios (ligadura, algodón, alcohol, agujas Vacutainer 20 o 21 G para adultos, tubos y etiquetas). Se daba a conocer el procedimiento a realizar con lenguaje sencillo acorde al nivel educacional y preparación del paciente, a fin de obtener la máxima colaboración por parte de éste. El ATS seleccionaba el sitio de punción, generalmente la zona de venas cefálicas o mediana cubital, cercanas al pliegue del antebrazo. Se practicaba la técnica según normas de bioseguridad de enfermería. Se realizaba la extracción de 5 tubos (2 tubos con EDTA, utilizados para la obtención del ADN y el plasma, 2 con ACD-B, utilizados para la obtención de células y plasma y 1 tubo PAXgene, utilizado para la obtención de ARN). Además se solicitaba al paciente una muestra de orina que era traspasado a un recipiente específico preparado para este tipo de muestra (frasco con 50 ul de ácido clorhídrico). La muestra era cuidadosamente etiquetada con los códigos del paciente y empaquetadas para el envío con la menor brevedad posible al IMID Biobank, por medio de un servicio de mensajería urgente contratado para el proyecto.

Posterior a la obtención de las muestras de sangre y orina se procedía a la cumplimentación del cuestionario epidemiológico por parte el ATS del proyecto y bajo la supervisión de la doctoranda.

Una vez realizado el cuestionario epidemiológico, la doctoranda procedía a cumplimentar el cuestionario clínico específico diseñado para AR. De forma sistemática primero se realizaba la obtención de datos del apartado de antecedentes familiares y luego de los apartados relacionados con la AR, que no fueran retrospectivos (medicación actual específica y no específica de la AR, presencia de comorbilidades y cuestionario HAQ) para lo cual se interrogaba al paciente. En casos de que el paciente no fuera capaz de aportar estos datos (i.e. medicación actual completa) en algunos casos se consultaban los datos respectivos del paciente disponibles en las historias clínicas del CAP (Centro de Asistencia Primaria).

Una vez finalizado el interrogatorio del paciente se procedía a la exploración física para determinar la actividad de la enfermedad en el momento de la inclusión en el estudio, que consistía en el recuento del número de articulaciones dolorosas y tumefactas.

Posteriormente de forma sistematizada se procedía a la obtención de los datos clínicos retrospectivos y las pruebas complementarias detalladas en el cuestionario clínico (i.e. reactantes de fase aguda y radiografías). En primer lugar se cumplimentaban los datos relativos a la enfermedad registrados en las historias clínicas respectivas de cada paciente. En segundo lugar se procedía a la obtención de los valores de la VSG que deberían haberse obtenido dentro de los 15 días previo a la inclusión del paciente al estudio. Por último se solicitaban radiografías de manos (palma-placa), pies (planta-placa) y cervical (frente y perfil en posición neutra y flexión) en caso de no disponer de radiografías recientes (<6 meses del día de la inclusión). Se realizaba el registro de estas radiografías con la lectura de cada una de ellas según el protocolo establecido previamente en el proyecto (esta información no ha sido analizada en el presente proyecto de tesis doctoral ya que será incluida como parte de otros proyectos).

La doctorando llevó a cabo un registro en paralelo en una base de datos (Casos-AR-IMID-kit) con la correlación del nombre del paciente y el número de código de la muestra. Con el objetivo de proteger la base de datos contra accesos no autorizados se procedió a la utilización de un sistema encriptado para protección de datos.

En la fase II, la doctorando fue la responsable del registro en la aplicación online <http://imid-kit-bsc.es> de los datos clínicos y serológicos de cada caso. Al igual que todos los centros participantes se dispuso de un usuario y una contraseña de acceso para la introducción de los datos clínicos de los pacientes del propio centro. La doctorando fue la responsable del registro de todos los 300 pacientes participantes en el proyecto PSE IMID-kit procedentes del Hospital *Universitari Vall d'Hebron*. Esta fase del estudio se realizó de acuerdo a la siguiente sistemática: solicitud de las historias clínicas al archivo del hospital, revisión de la historia clínica de AR de la consulta externa, obtención de los datos requeridos e introducción en la aplicación *online*.

Este proceso se realizó de una manera gradual y el mayor volumen de trabajo se llevó a cabo una vez finalizada la selección de los pacientes y el proceso de obtención

de las muestras. Esta fase se extendió a lo largo de tres meses, durante el periodo aproximado entre junio de 2011 (al finalizar la residencia) y setiembre del 2011.

A partir de setiembre del 2011, la doctorando se incorporó formalmente y a dedicación completa en el *Grup de Recerca de Reumatologia* del *Institut de Recerca del HUVH* para iniciar el periodo formativo en investigación básica del presente proyecto de tesis doctoral.

### **Control de calidad y seguimiento del registro de los datos clínicos asociados de los pacientes con AR de cada uno de los centros participantes en el Proyecto PSE IMID-Kit**

Una vez finalizado el periodo de selección e inclusión de pacientes (i.e. obtención de muestras biológicas y datos clínicos asociados) con AR del centro participante HUVH, la doctorando fue la responsable de controlar, bajo la supervisión de la directora del proyecto la Dra. Sara Marsal, el estado del registro del total de los 2.313 pacientes con AR incluidos en el proyecto PSE IMID-Kit.

En cada uno de los centros participantes de la Comisión clínica de AR se realizó el proceso de selección e inclusión de pacientes de forma similar al descrito previamente para los pacientes del HUVH. De tal forma un residente de 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> año había introducido los datos clínicos del cuestionario clínico de los pacientes con AR de su centro en la aplicación <http://imid-kit-bsc.es>. El siguiente paso fue realizar el control de calidad y supervisar el grado de cumplimentación de los datos de cada centro.

Este proceso se llevó a cabo por medio del contacto directo y continuo con los diferentes residentes de cada centro. De esa forma se mantenía un trabajo coordinado entre el residente, el responsable de la base de datos del BSC y la doctoranda. En primer lugar se realizó la evaluación del estado de cumplimentación de los 13 centros participantes en el proyecto. Se elaboró una lista de incidencias por caso y por centro que fue remitida a cada investigador colaborador. Las incidencias consistían en un registro de campos por variable no completos o cumplimentados de forma incorrecta. Estas incidencias eran comunicadas por e-mail y en algunos casos también por teléfono al residente o al investigador principal.

Las incidencias eran resueltas, bien a través de facilitar los datos a la doctorando y ésta las introducía o corregía en la aplicación *online* o bien a través del contacto entre el centro y el BSC. El cierre de los casos se realizaba una vez que el caso estaba completo o cuando en su defecto la doctoranda, el investigador colaborador, el coordinador clínico de la comisión de AR y la Dra. Sara Marsal acordaban que se habían agotado todos los recursos posibles para complimentar una determinada variable.

Se identificó en la mayoría de los centros que el apartado referente a las terapias biológicas, fue el apartado con más incidencias, seguido del apartado destinado al registro de las características clínicas y biológicas de la enfermedad. Específica-

mente para este proyecto de tesis doctoral se insistió enérgicamente (por e-mail y en algunos casos de forma presencial) en la cumplimentación del apartado referente a los valores del DAS28 a la semana basal y la semana 12 imprescindibles para la inclusión del paciente en este proyecto de tesis doctoral.

### **Aprendizaje de los métodos de análisis incluidos en el estudio de biomarcadores genéticos y no genéticos.**

La doctorando, una vez incorporada a dedicación completa en el *Grup de Recerca de Reumatologia* (GRR) y de forma paralela al control de calidad del registro de los datos clínicos del proyecto PSE IMID Kit, inició el aprendizaje de determinadas herramientas de análisis necesarias para la realización del presente proyecto. Este aprendizaje se llevó a cabo bajo la supervisión de la Dra. Marsal y del coordinador del equipo de bioinformática del GRR, el Dr. A. Julia.

Al finalizar el periodo de análisis de los biomarcadores genéticos y no genéticos la doctorando había adquirido los conocimientos y las habilidades técnicas necesarias para llevar a cabo los análisis o controles que se citan a continuación.

- Control de calidad de clusters de genotipado de la plataforma de genotipado GWAS Illumina (*GenomeStudio*).
- Control de calidad del genotipado de microarrays de genotipado: MAF, *Call Rate*, Equilibrio *Hardy-Weinberg*, correlación con Componentes Principales de Variación.
- Análisis de asociación estadística: construcción de tablas de contingencia, test alélico y test genético chi-cuadrado.
- Estimación del riesgo alélico: Odds Ratio e Intervalos de confianza.
- Métodos de corrección por tests múltiples (Bonferroni, False Discovery Rate).
- Búsqueda de información para marcadores tipo SNP (*base de datos NCBI-SNP y Hapmap*); ubicación cromosómica, características genéticas y distribuciones poblacionales.
- Elaboración y curado de bases de datos clínicas mediante hojas de trabajo *Excel*. Detección de individuos o valores clínicos extremos.
- *Software estadístico SPSS* (Windows): construcción de tablas de trabajo, generación de estadísticos univariados, análisis de regresión lineal, uso de covariables en modelos lineales.
- Búsqueda de textos científicos en base de datos *NCBI Pubmed* y *Google Scholar*. Interpretación de la funcionalidad génica en el contexto de la Artritis Reumatoide y de procesos inmunológicos.

- Métodos de gestión automática de citas bibliográfica Mendeley. Programa de maquetación *InDesign* (Adobe).

Este periodo se ha extendido desde su incorporación al *Grup de Recerca del Reumatologia* en septiembre de 2011 hasta la finalización de la escritura del presente proyecto de tesis doctoral, a mediados de octubre de 2012.

### 3.- Sujetos del estudio

En el proyecto PSE IMID-Kit se incluyeron 2.313 pacientes con AR de los cuales 881 pacientes habían sido tratado con terapia anti-TNF $\alpha$  y de estos, en 628 pacientes se disponía de los datos clínicos completos referentes a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . El reclutamiento de los pacientes no estuvo sujeto a ningún tipo de muestreo, sino que se les propuso la entrada a todos los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión, atendidos de forma consecutiva en cada uno de los servicios de Reumatología de los centros participantes en el proyecto IMID-Kit.

Todos los pacientes con AR incluidos en el presente proyecto de tesis doctoral cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión definidos en el proyecto PSE IMID-Kit. Estos criterios se detallan a continuación:

#### **Criterios de inclusión generales**

1. Pacientes que cumplan los criterios diagnósticos de AR definidos por el ACR (1987)<sup>(67)</sup>
2. AR de más de dos años de evolución desde el inicio de los síntomas
3. Edad  $\geq$  a 18 años
4. Caucásico
5. Abuelos y padres de origen español

#### **Criterios de exclusión**

1. Antecedentes de psoriasis cutánea
2. Antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal (Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa)

Los pacientes con AR incluidos en el proyecto PSE IMID-kit y que cumplieran los criterios definidos previamente fueron un total de 2.313. Para la selección de los pacientes incluidos en el presente proyecto de tesis doctoral se establecieron unos criterios adicionales que se detallan a continuación:

#### **Criterios de inclusión específicos**

1. Pacientes con AR que habían recibido un fármaco anti-TNF $\alpha$  (IFX, ETA, ADA) como primera terapia biológica (n=881)
2. Pacientes con el apartado de terapia biológica del cuestionario específico de AR debidamente cumplimentado (valores del índice DAS28 SB y S12) (n=661).
3. Pacientes con un índice DAS28 a la semana basal  $>3,2$  (n=628)

Un total de 628 pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión específicos, participaron en el estudio de los biomarcadores no genéticos (i.e. clínicos, epidemiológicos y serológicos).

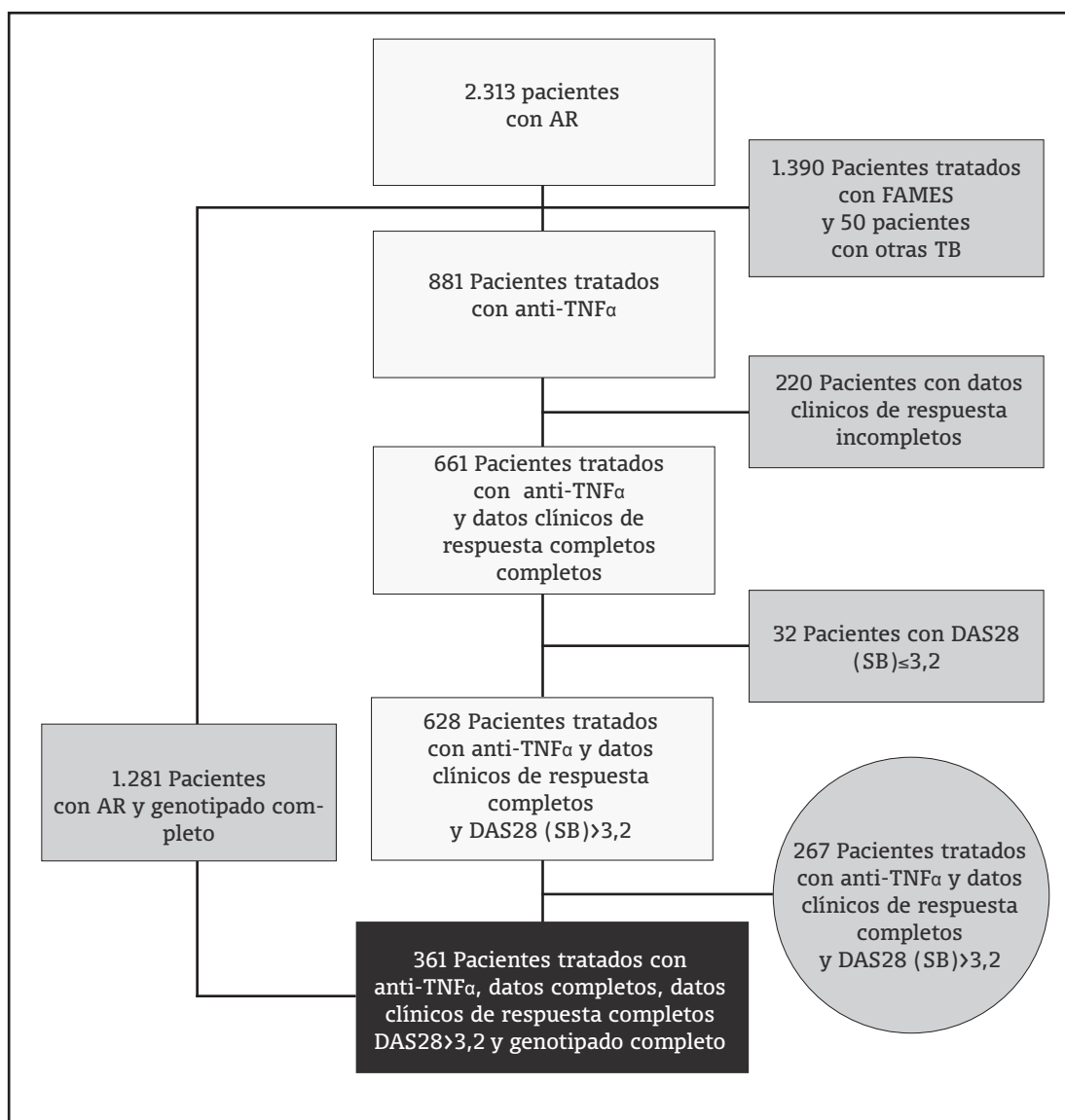
Para el estudio de los biomarcadores genéticos fueron incluidos aquellos pacientes a los que se le había realizado un genotipado completo como parte del proyecto PSE IMID-Kit y que cumplieran los criterios de inclusión específicos del



presente proyecto. Un total de 374 pacientes cumplían ambos requisitos. Posterior al control de calidad realizado a la muestra y al genotipado que posteriormente explicaremos con más detalle, 361 pacientes participaron en el estudio de los biomarcadores genéticos.

En el siguiente diagrama de flujo se presenta de forma esquemática el proceso de selección de los pacientes incluidos en este proyecto de tesis doctoral.

**Diagrama de flujo:** Proceso de selección de los pacientes con AR incluidos en el estudio



**TB:** terapias biológicas, **SB:** semana basal

## 4.- Análisis de Biomarcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Como fase previa al inicio del estudio de los biomarcadores, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura para determinar aquellos biomarcadores genéticos y no genéticos que hubieran sido asociados con anterioridad a la respuesta y a la remisión en pacientes con AR en tratamiento con fármacos de acción anti-TNF $\alpha$ . Para este objetivo se utilizó el buscador de la base de datos bibliográfica biomédica PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Para identificar los estudios más relevantes al respecto se utilizaron las palabras claves “rheumatoid arthritis”, “response”, “remission”, “anti-TNF $\alpha$ ”, se utilizaron las diferentes combinaciones con estos términos utilizando los operadores lógicos “OR” y “AND”.

De un total de 1.480 artículos, fueron seleccionados 36 artículos, tras filtrar por aquellos estudios que incluían pacientes con el diagnóstico de AR según los criterios del ACR y que eran mayores de 18 años de edad. Se incluyeron solo aquellos estudios que evaluaban un posible biomarcador asociado a la respuesta definida según criterios EULAR o ACR y a la remisión considerada como un índice DAS28 menor a 2.6 (18 artículos sobre biomarcadores no genéticos y 18 sobre biomarcadores genéticos). Fueron incluidos aquellos artículos en idioma inglés cuyo contenido estaba disponible en versión electrónica (>95%).

En base al tipo de biomarcador de interés en los artículos seleccionados, estos fueron clasificados en dos grupos:

**Grupo A:** Biomarcadores no genéticos (epidemiológicos, clínicos (i.e. relacionados con la actividad de la enfermedad) y serológicos).

**Grupo B:** Biomarcadores genéticos (polimorfismos de genes candidatos (i.e. gen *TNFA*) y estudio de asociación de genoma completo ó GWAS).

### 4.1.- Análisis de los biomarcadores no genéticos de respuesta

#### 4.1.1.- Descripción de las variables a estudio

Una vez analizada toda la literatura disponible se seleccionaron aquellas variables del cuestionario clínico específico de la AR y del cuestionario epidemiológico que podrían estar asociadas a la respuesta y a la remisión clínica en pacientes con AR tratados con los diferentes anti-TNF $\alpha$  (IFX, ETA y ADA).

##### A) Variables Epidemiológicas

- Género
  - Masculino
  - Femenino
  
- Nivel de estudios
  - Básico: ninguno, educación primaria
  - Medio-alto: formación profesional de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> grado, bachillerato superior,

diplomatura, licenciatura y doctorado.

- Consumo de tabaco al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ 
  - Fumador activo
  - Exfumador (interrupción del hábito por un periodo superior a 1 año).
  - No fumador

Para el análisis de biomarcadores se ha considerado a los fumadores activos y a los exfumadores en un mismo grupo vs el grupo de los no fumadores

- Consumo de alcohol
  - Si: consumo de vino con las comidas y fuera de las comidas, consumo de cerveza a diario o solo los fines de semana y consumo de copas a diario o solo los fines de semana.
  - No: ninguna de las situaciones anteriores.

#### B) Variables Clínicas

- Años de evolución de la enfermedad
  - Definido como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la AR y el inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ .
- Edad del paciente al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ .
- Número de FAMES a la inclusión en el estudio.
  - Esta variable se ha considerado de dos formas: la primera de forma binaria ( $\geq 2$  FAMES previos y  $< 2$  FAMES previos) y la segunda como una variable continua.
- Número de comorbilidades asociadas a la AR a la inclusión en el estudio.
  - Esta variable se ha considerado de dos formas: la primera de forma binaria ( $\geq 2$  comorbilidades y  $< 2$  comorbilidades) y la segunda como una variable continua.
- Factor Reumatoide
  - Positivo: según la referencia del laboratorio de cada centro
  - Negativo: según la referencia del laboratorio de cada centro

Se consideraron los títulos más elevados registrados en los cuestionarios clínicos.

- Anticuerpos anti-CCP
  - Positivo: según la referencia del laboratorio de cada centro
  - Negativo: según la referencia del laboratorio de cada centro

Se consideraron los títulos más elevados registrados en los cuestionarios clínicos hasta el momento del inicio del estudio

- El índice DAS28 a la semana basal (SB) a la semana 12 (S12) de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

### C) Variables calculadas para definir la respuesta al tratamiento

- $\Delta$ DAS28
  - Definido como la diferencia entre el DAS28 (SB) y el DAS28 (S12) de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .
- Respuesta clínica
  - Respondedores: se ha considerado respondedores a los pacientes que alcanzan una respuesta EULAR buena o moderada.
  - No respondedores: se ha considerado no respondedores a los pacientes que no alcanzan una respuesta EULAR buena o moderada.
- Remisión
  - Definida como un índice DAS28  $<2.6$  a la S12 de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

Todas estas variables descritas han sido utilizadas en el análisis para determinar los posibles biomarcadores epidemiológicos, serológicos y clínicos de respuesta y de remisión en pacientes con AR a la semana 12 de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

#### 4.1.2.- Análisis estadístico de los biomarcadores no genéticos

Para el análisis de las variables clínicas se descargaron los datos al servidor del GRR. Estos datos fueron exportados a una base de datos en una hoja de cálculo de *Microsoft Excel versión 97-2003* para facilitar su exploración y análisis.

El análisis descriptivo incluyó para las variables continuas, la media y la desviación estandar (DE) y para las categóricas las frecuencias. Para identificar las diferencias más importantes entre los tres grupos de tratamiento (IFX, ETA, ADA) se utilizó el test estadístico ANOVA. Para el análisis de asociación de las variables clínicas en relación a la respuesta se utilizó la regresión logística univariante y multivariante con el objetivo de identificar biomarcadores de respuesta y de remisión, y evaluar la posible existencia de variables de confusión. Los resultados de ambos modelos fueron representados por el OR con su intervalo de confianza (IC) del 95% correspondiente. A fin de facilitar la interpretación de los resultados en el cuadro 6, se presenta la categorización de las variables utilizadas para la realización del análisis univariante y multivariante.

El contraste de normalidad de la variable  $\Delta$ DAS28, variable utilizada para el análisis de asociación genética, fue realizado con el *Test de Shapiro–Wilk*.

Para este análisis estadístico se utilizaron los programas SPSS versión 19.0 (<http://www-01.ibm.com/software/es/analytics/spss/>) y R versión 2.13 ([www.cran.org](http://www.cran.org)).

Para el análisis de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas se consideró como significación estadística a un valor de  $P < 5E-02$ .

**Cuadro 6.** Categorización de las variables a estudio para la interpretación del análisis univariante y multivariante

<b>Variables</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Respuesta	Respondedor	No respondedor
Remisión	Remisión	No remisión
Género	Femenino	Masculino
Nivel de estudios	Básico	Medio-Alto
Tabaco	Fumador/exfumador	No fumador
Consumo de alcohol	No	Si
FR	FR (-)	FR (+)
anti-CCP	anti-CCP (-)	anti-CCP (+)
Edad al inicio del tratamiento	Numérico	
anti-TNF $\alpha$	Numérico	
Años de evolución de la enfermedad	Numérico	
Nº de FAMES previos	Numérico	
DAS28 (SB)	Numérico	

## 4.2.- Análisis de los biomarcadores genéticos de respuesta

### 4.2.1.- Genotipado Completo

Se llevó a cabo el estudio de GWAS en 1.281 pacientes con AR de los cuales 361 cumplían los criterios de inclusión del presente proyecto. A continuación se detallarán los diferentes pasos realizados desde la extracción del ADN hasta el análisis final de los biomarcadores genéticos.

#### Obtención del ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de sangre periférica mediante la utilización del robot *Chemagic Magnetic Separation Module I* y el kit de extracción *Chemagic DNA Blood Kit special (10ml)* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany).

Este robot permite, en función del kit de extracción utilizado, la extracción automatizada de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas variadas como sangre, saliva, heces, etc. El rendimiento de la extracción a partir de 1ml de sangre es de 20-40 microgramos de ADN de elevada pureza.

Esta tecnología se basa en la utilización de partículas magnéticas que se unen a los ácidos nucleicos de la muestra permitiendo su separación mediante la

atracción de éstas por una barra metálica magnetizada. El protocolo de extracción de ADN a partir de sangre total consta de dos fases: una de lisis celular y otra de purificación del ADN. En esta última fase la barra magnética desplaza los ácidos nucleicos, unidos a las partículas magnetizadas, por una serie de soluciones de lavado constituidos por una base de etanol y una concentración de sales decreciente. En cada uno de los lavados el electroimán deja de imantar las partículas magnetizables permitiendo que éstas, con el ADN adherido, queden en suspensión en la solución de lavado, para ser posteriormente recapturadas al magnetizarse de nuevo. Una vez finalizado el proceso de lavado, el ADN se separa de las partículas magnéticas al entrar en contacto con el *buffer* de elución. Todo el procedimiento tiene una duración de aproximadamente 50 min (<http://www.chemagen.com/chemagic-star-kits.html>).

En el IMID-Biobank la trazabilidad de las muestras y de los productos derivados es un punto muy importante. Por este motivo se utiliza un sistema de identificación por código único para cada una de las donaciones incluidas en el biobanco gestionado por una aplicación informática que asegura la trazabilidad de la muestra en todo momento, desde su incorporación al biobanco hasta la ubicación de sus productos derivados en los almacenes. Existen varias herramientas informáticas de gestión de muestras para biobancos. En nuestro caso se utiliza una aplicación desarrollada por Vitrosoft SA (<http://www.vitrosoft.com/>).

Para el almacenamiento de determinados productos, entre los que se encuentra el ADN, se utilizan tubos identificados mediante códigos bidimensionales que aseguran la no corruptibilidad del sistema de identificación a lo largo del tiempo y reducen extraordinariamente la probabilidad de error durante la identificación de las muestras. En nuestro caso se utilizan unidades de almacenamiento del fabricante *Micronic* (<http://www.micronic.com/>), aunque en el mercado existe una amplia variedad de opciones.

El ADN, al igual que otros productos como son el plasma o la orina, una vez almacenado se mantiene a  $-80^{\circ}\text{C}$  y sólo en el momento en el que se necesita extraer una alícuota, se mantiene a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se mantiene un registro continuo de la temperatura a la que se encuentran las muestras mediante sondas de temperatura instaladas en cada uno de los congeladores. La información de cada congelador es remitida a un ordenador central en el que se almacena esta información a modo de registro histórico y para su posterior análisis en caso de ser necesario. El almacén de las muestras cuenta con sistemas de alarma para detectar a tiempo posibles interrupciones de energía o fallos en el funcionamiento de los equipos de congelación y permitir actuar de la manera más adecuada para preservar los productos almacenados en todo momento.

## Preparación del ADN para el genotipado completo

Para la preparación de las muestras de ADN para su análisis en la plataforma de genotipado, se procedió a la localización de las muestras seleccionadas para el estudio mediante la utilización de la aplicación informática de gestión del biobanco. Una vez se obtuvo la relación de los códigos, dos técnicos de laboratorio realizaron la búsqueda de las alícuotas en los almacenes del biobanco, manteniendo en todo momento dichas alícuotas en un lecho de hielo. Utilizando la misma aplicación informática y un escáner, se comprobaron los códigos de las alícuotas de ADN.

Se separó un pequeño volumen (20 $\mu$ l) de muestra y se transfirió al pocillo adecuado de una placa de 96 pocillos, que había sido previamente diseñada y etiquetada y en la que se habían depositado 20 $\mu$ l de *búffer* TE. De esta manera en cada pocillo había un volumen total de 40 $\mu$ l de solución de ADN a una concentración de 50ng/ $\mu$ l.

En el diseño de la placa para el genotipado, realizado previamente, se buscó la distribución más heterogénea posible de las muestras plaqueadas, intentando alternar en la medida de lo posible las muestras de las diferentes enfermedades y de los individuos control, minimizando así posibles sesgos futuros.

La placa, una vez preparada, fue sellada y mantenida a -80°C hasta el momento de su envío en hielo seco y transporte urgente para su análisis.

El IMID-Biobank proporcionó al centro de genotipado un archivo con la distribución de las muestras en la placa. El código identificador de las muestras enviadas fue diferente al código original, para eliminar la posibilidad de identificación de las muestras por parte del centro de genotipado y preservar así la identidad del donante.

## Elección de la plataforma para el genotipado completo

Un microarray de ADN (también conocido como un chip de ADN) es una disposición ordenada de diferentes sondas de ADN fijados a un sustrato sólido. En base a la propiedad de hibridación complementaria del ADN, cada grupo de sondas sólo se une de forma específica a sus secuencias complementarias. Por tanto, si una muestra problema es marcada (i.e. radiación, fluorescencia) se puede detectar su nivel de hibridación en el microarray. De esta forma, los microarrays de ADN se utilizaron por primera vez a finales de los 90 para determinar la expresión génica de un genoma (i.e. el transcriptoma) <sup>(328)</sup>. Posteriormente, esta tecnología se adaptó al análisis de la variación genética o genotipado de polimorfismos de un único nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). De esta forma, un único microarray puede actualmente genotipar más de >1E6 SNPs diferentes o analizar la expresión de todos los genes del genoma humano de forma rápida y simultánea.

Los SNPs son marcadores ideales para identificar genes asociados con enfermedades complejas por tres razones principales. Primero, los SNPs están densamen-

te ubicados en el genoma humano (1 SNP por aproximadamente 500-1000 pares de bases). Segundo, existe un importante número de plataformas comerciales disponibles para el genotipado automatizado de SNPs<sup>(329,330)</sup>. Finalmente también tienen la ventaja de tener una tasa muy baja de mutación (i.e. son estables en el tiempo).

Estas plataformas están diseñadas para diferentes propósitos y entre ellos difieren en la selección de SNPs, en la reacción química, en la señal de detección, rendimiento, costo y flexibilidad del ensayo. Las plataformas más utilizadas para el genotipado son los microarrays de la plataforma *Affymetrix* ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) (Santa Clara CA, EEUU) y de la plataforma *Illumina* ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) (San Diego CA, EEUU). Generalmente, la química para el genotipado de SNPs puede ser dividida en dos tipos basándose en los tipos de reacción que permiten la detección del SNPs: la hibridación diferencial no enzimática y la reacción enzimática<sup>(312)</sup>. La hibridación diferencial se basa en el uso de sondas concordantes y parcialmente discordantes que se unen a secuencias de ADN diana. El microarray *Affymetrix* SNP emplea este principio. Por cada SNPs son utilizadas entre 4 a 6 sondas, pudiendo llegar a contener una alta densidad de sondas acomodadas en un solo chip. La última plataforma de *Affymetrix 6.0* contiene sondas de 906.600 SNPs y un adicional de 946.000 sondas para evaluar las variaciones del número de copias (*Copy Number Variants* ó *CNVs*)<sup>(328, 330)</sup>.

Estos millones de sondas se hibridan con las secuencias de sus objetivos bajo las mismas condiciones de temperatura y tampón durante el mismo tiempo, lo cual es ideal para la automatización de alto rendimiento de genotipado de SNPs. Sin embargo, las sondas tienen que ser eficaces en la diferenciación de las secuencias coincidentes y no coincidentes. Esto impone unas restricciones para algunas SNPs que están ubicadas en regiones complejas del genoma. En consecuencia, algunos SNPs no pueden ser estudiados, aunque sean SNPs funcionalmente importantes como SNPs de regiones regulatorias o SNPs que producen un cambio de aminoácido en la proteína<sup>(329,330)</sup>.

La tecnología *Illumina BeadArray* (Illumina, San Diego, CA, US) utiliza la extensión del *primer* para distinguir los dos alelos del SNP. Estas plataformas se llaman *BeadChips* porque consisten en una matriz de cuentas de escala micrométrica, cada una con una secuencia complementaria a una secuencia de un alelo específico de un SNPs. Después de la amplificación del ADN, éste es hibridado con sondas de 50 bases de largo fijadas a los *beads* micrométricos característicos de la plataforma (Figura 4). Finalmente, una enzima lleva a cabo la extensión de la secuencia fijada, dando lugar a una señal fluorescente que es posteriormente registrada por un escáner de alta resolución. La cantidad de fluorescencia registrada se utilizará por tanto para caracterizar el genotipo del individuo<sup>(328)</sup>.

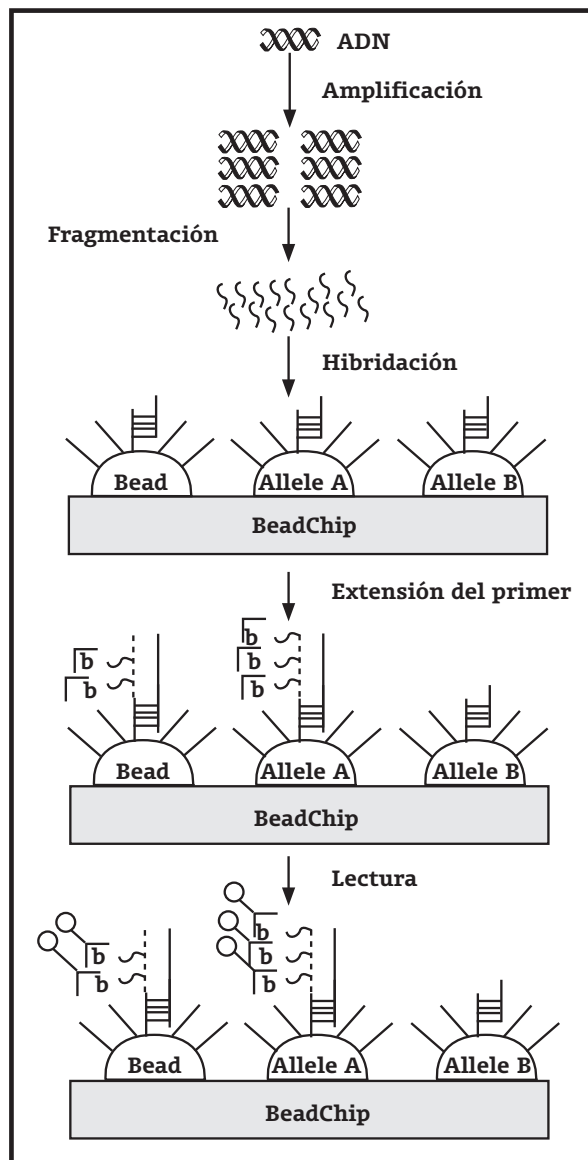
Otra diferencia importante entre estas dos plataformas es la estrategia utilizada para la selección de los SNPs representativos del genoma. Una de ellas es seleccionar al azar los SNPs que se encuentran relativamente espaciados uniformemente en todo el genoma, no teniendo en cuenta el DL que existe entre los SNPs, como es el caso de la plataforma de *Affymetrix*. La otra técnica consiste



en seleccionar “tag SNPs”, basada en medidas de DL elegidos para maximizar la cobertura. En este caso se utiliza la información de la base de datos del Proyecto *HapMap* y es la técnica utilizada por la plataforma de *Illumina* <sup>(328,330)</sup>.

Debido a esta diferencia entre ambas plataformas existe una diferencia significativa en cuanto a la cobertura entre los distintos chips a pesar de no tener diferencias en cuanto al poder en forma significativa. Como un ejemplo, la cobertura en la población caucásica *HapMap* ( $r^2 \geq 0,8$ ) proporcionado por la *Affymetrix 500K* e *Illumina 600K* son de 67% y 87% respectivamente, objetivándose una diferencia del 22%. <sup>(330, 331)</sup>.

**Figura 3:** Ensayo de genotipado *Infinium 1 GWAs*



El ensayo de genotipado *Infinium 1*, tiene 4 pasos principales (1) Amplificación y fragmentación del ADN genómico. (2) Hibridación de los segmentos de ADN objetivo a las sondas específicas de cada alelo. (3) Extensión de la secuencia fijada (4) Lectura. Adaptado del artículo de Steemers FJ et al (2005)

## Lugar de realización del genotipado completo

El genotipado del genoma completo se llevó a cabo en el Nodo del Centro Nacional de Análisis Genético (CeGEN) ubicado en Madrid. Los datos brutos de genotipado (ficheros binarios \*.bsc) fueron enviados al *Grup de Recerca de Reumatologia del Institut de Recerca del l'Hospital Universitari Vall d'Hebron*, donde se generaron los genotipos de SNPs. Los genotipos de SNPs fueron obtenidos mediante el software *GenomeStudio* de Illumina. Todos los análisis estadísticos asociados al análisis clínico y genético se llevaron a cabo en el GRR-IRHVVH.

### 4.2.2.- Control de calidad del estudio de asociación de genoma completo

El control de calidad de los GWAS es fundamental para asegurar la robustez de los resultados de asociación. El control de calidad se realiza a dos niveles: a nivel del individuo y a nivel de los SNPs.

En primer lugar, se debe valorar la calidad de las muestras incluyendo solo aquellas muestras con un genotipado eficiente (>95% de los SNPs genotipados de forma satisfactoria).

Una vez que las muestras que fallan el control de calidad son eliminadas, se evalúan los SNPs en forma individual según los parámetros de calidad para detectar los posibles errores de genotipado que incluyen:

- La proporción de las muestras en la que el SNP puede ser detectado (>95%)
- La frecuencia del alelo menor
- Las desviaciones importantes del equilibrio *Hardy-Weinberg* (HW).

Los SNPs con MAF (*Minor Allele Frequency*) bajos son más propensos a error, ya que al existir un menor número de muestras dentro de un clúster de un genotipo, los algoritmos de frecuencias utilizados podrían no funcionar en forma correcta con alelos raros y esto puede conducir a la elevación del error tipo I<sup>(331, 332)</sup>.

El equilibrio HW es una pieza clave cuando se estudian asociaciones entre polimorfismos genéticos y enfermedades. En estudios de casos y controles, los controles tienen como función representar a la población general no enferma<sup>(333, 334)</sup>. El equilibrio HW es una ley de la genética poblacional que determina una relación matemática entre las frecuencias de los alelos de un marcador y la frecuencia de los genotipos del mismo marcador. En ausencia de grandes cambios a nivel poblacional como procesos de selección natural o migraciones esta relación debe mantenerse. No obstante, en la práctica el análisis del equilibrio de HW más que para el estudio genético poblacional se utiliza como un parámetro de calidad del genotipado. Si un SNP ha sido genotipado deficientemente es muy probable que sus frecuencias alélicas y genotípicas sean aberrantes y dejen de cumplir el equilibrio de HW<sup>(331)</sup>.

En resumen solo se consideraron los SNPs que eran detectados en >95% de las muestras, las muestras con >95% del genotipado, una frecuencia del alelo menor >5% y que estén en equilibrio Hardy Weinberg ( $P > 0.0001$ ).

## Estratificación de la población

Cuando dos o más poblaciones han sido separadas por las fronteras geográficas o culturales durante muchas generaciones, las mutaciones espontáneas, las presiones diferenciales de selección y otros factores pueden dar lugar a diferencias de frecuencia alélica entre las poblaciones. Si estas poblaciones genéticamente diferenciadas posteriormente conviven en una misma área geográfica, pueden dar lugar a problemas en los estudios genéticos. Por ejemplo, si existen dos subpoblaciones con ancestros genéticos muy diferenciados y se incluyen proporciones de éstas diferentes en los grupos caso y control, es muy probable que aparezcan diferencias en las frecuencias alélicas. Sin embargo, estas diferencias se deberán muy probablemente a la variación ancestral característica de cada subpoblación y no tendrán relación con la enfermedad a estudio. Este fenómeno se conoce como estratificación poblacional y puede enmascarar verdaderas asociaciones entre el genotipo y el fenotipo y producir tanto resultados falsos negativos como positivos<sup>(335, 336)</sup>.

La estratificación de la población es una de las mayores preocupaciones en los estudios de enfermedades complejas y prevalentes como la AR. Sin embargo en los estudios GWAS, el alto número de marcadores analizados permite identificar con claridad la existencia de estratificación y eliminar su efecto negativo del estudio.

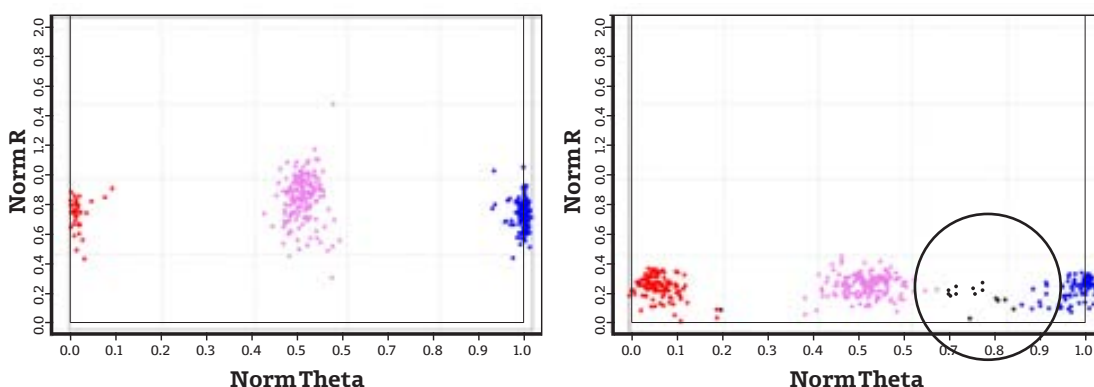
En primer lugar, se suele calcular un estadístico diagnóstico llamado factor de inflación  $\lambda$ . Este factor de inflación se obtiene del promedio de tests estadísticos de todo el genoma. En los casos que existe estratificación este promedio se verá aumentado y alejado del valor nulo que es 1.

Otra estrategia muy potente para el estudio de la estratificación es el análisis de los componentes principales (*Principal Component Analysis o PCA*). El PCA es un método matemático para la reducción de la dimensionalidad, que permite identificar los ejes principales de variación de un conjunto de datos. En el presente estudio se ha utilizado el método *Eigenstrat* para llevar a cabo este análisis<sup>(337)</sup>. Mediante el análisis de una selección de marcadores independientes representativos de todo el genoma (i.e. ~100.000 SNPs) se calcula el PCA para obtener los principales ejes de variación de la muestra (i.e. los componentes principales). En general, se ha observado que el primer y segundo componente principal tienen una fuerte correlación con la ubicación geográfica en España<sup>(316)</sup> y en Europa en general<sup>(336)</sup>. Una vez se han obtenido los componentes principales, éstos pueden ser utilizados como variables de ponderación en el análisis de asociación.

## Representación de los SNPs

En el presente estudio también se tuvo en cuenta como control de calidad la representación de cada SNP en cada clúster. Los datos de cada SNP pueden ser representados, según la intensidad de la señal de cada alelo, A vs B, donde cada punto representa un individuo diferente. Si el procedimiento se ha realizado correctamente los individuos se ubican en los diferentes tres genotipos posibles representados por los tres diferentes clusters, de los cuales el del centro representa a los individuos heterocigotos, tal y como se observa en la figura 4.

**Figura 4:** Distribución de intensidades y genotipos asignados para 2 SNPs diferentes



En estos dos gráficos se muestran las intensidades en coordenadas polares de dos SNPs. Cada punto representa un individuo y los colores el genotipo que le ha sido asignado. Cuando el genotipo de un individuo no puede asignarse con una alta fiabilidad éste se excluye del análisis posterior. Si los individuos con genotipo no asignado (color negro) superan el 5% del total la SNP se excluye del estudio en el control de calidad.

### 4.2.3.- Análisis estadístico de los biomarcadores genéticos

Para el análisis de los biomarcadores genéticos se ha considerado la metodología de los tres estudios GWAS publicados previamente y se ha optado por realizar el análisis de asociación considerando dos variables: el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta clínica que se basa en los criterios de respuesta EULAR, tal y como hemos comentado en el apartado de variables analizadas. También se realizó un análisis funcional tal como lo describe Krintel et al utilizando el programa GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) como otra estrategia de análisis en nuestro estudio GWA.

En relación a la primera estrategia existe una amplia metodología para el estudio de *loci* asociados a rasgos cuantitativos o QTLs (i.e. *Quantitative Trait Loci*). Para el presente estudio se utilizó el  $\Delta$ DAS28 como una variable continua dependiente y se realizó el análisis por medio del test de regresión lineal utilizando el *software* de análisis genómico *PLINK* versión 1,07<sup>(338)</sup>. Para este análisis se consideró el DAS28 (SB) dentro del modelo de regresión lineal y así controlar el potencial sesgo que esta covariable pueda tener en los resultados de asociación. No se incluyó ninguna otra variable epidemiológica, clínica o serológica en este análisis.

Se optó por este análisis ya que, en estudios donde el tamaño muestral es relativamente pequeño en comparación al número de variables estudiadas (como los GWAS), el uso de variables continuas en lugar de variables dicotómicas puede permitir aumentar el poder estadístico del estudio. Cabe destacar que todos los GWAS de respuesta anti-TNF $\alpha$  realizados hasta la fecha han utilizado esta misma estrategia para aumentar la capacidad de cribado.

La segunda estrategia utilizada, considerando su aplicabilidad en la práctica clínica diaria, fue el análisis de asociación de los SNPs con respecto a la respuesta clínica basada en la utilización de los criterios EULAR de respuesta tal y como se realiza en el estudio de Liu et al y en el de Krintel et al. Para este análisis se utilizó el test estadístico de asociación alélica  $\chi^2$ . La dirección y tamaño del efecto genético fue representada por el OR, que se calculó en base al alelo menor y al riesgo de no respuesta.

En la actualidad se considera una asociación significativa a nivel genómico aquella asociación con un valor  $P$  nominal igual o inferior a  $5E-08$ . Este nivel de significación es mayor que el de una corrección de Bonferroni por el número de SNPs analizadas en nuestro caso y por tanto es muy conservadora. Por este motivo en este estudio, se consideraron también como de interés aquellos SNPs con una significación  $P \leq 5E-04$ .

Posteriormente se realizó la selección de los SNPs candidatos teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Aquellos SNPs que alcanzaron un valor de significación de  $P \leq 5E-04$ , en ambos modelos de análisis utilizados (i.e.  $\Delta$ DAS28 y respuesta clínica EULAR).
- Aquellos SNPs que alcanzaron un valor de  $P \leq 5E-4$  en alguno de los modelos de análisis y que estuvieran situados en *loci* funcionalmente asociados a la fisiopatología de la AR.
- Aquellos SNPs que alcanzaron un valor de  $P \leq 5E-04$  en alguno de los modelos de análisis y que fueran SNPs no sinónimos (i.e. SNPs que dan lugar a un cambio de aminoácido).

En un estudio de asociación de genoma completo los SNPs son el elemento principal sobre el que se efectúa todo el análisis estadístico de asociación. No obstante existen otras opciones para evaluar asociaciones a nivel genómico. Una de ellas es el análisis de enriquecimiento de vías génicas (GSEA), que fue la tercera estrategia utilizada. El objetivo de esta estrategia fue detectar conjuntos de genes funcionalmente relacionados asociados con el fenotipo. Este tipo de análisis se inicia seleccionando, dentro del conjunto de SNPs genotipados en cada gen, aquellos que han resultado más asociados al fenotipo estudiado.

Una vez que se obtiene este estadístico representativo de cada gen, se calcula un *score* basado en la evaluación conjunta de los estadísticos de asociación de todos los genes que integran una vía génica. Finalizado el análisis se seleccionan

aquellas vías génicas asociadas al  $\Delta$ DAS28 y a la respuesta EULAR con un valor de  $P < 5E-02$ .

Este *score* evalúa la sobrerrepresentación de una vía o grupo génico en el conjunto de SNPs más asociados respecto al conjunto de SNPs menos asociados. El método cuantifica la aleatoriedad de cada observación y, por tanto, permite estimar un valor  $P$  de significación.

### Corrección de test múltiples

Probablemente el mayor desafío en los estudios genéticos a gran escala proviene del análisis de múltiples test (cientos de miles de test) de donde pueden provenir muchos resultados significativos fruto del azar lo que dificulta diferenciar las señales verdaderas de la variación aleatoria<sup>(328, 330)</sup>.

El problema de los test múltiples se presenta porque, si muchas hipótesis son analizadas simultáneamente, algunos de los test estadísticos podrían dar resultados llamativamente extremos, aumentando la probabilidad de rechazar la hipótesis nula aunque esta sea falsa. El análisis de múltiples test debe estar diseñado para ejercer el control sobre todo el conjunto de hipótesis, para evitar que estudios de este tipo arrojen resultados que pueda atribuirse a la casualidad<sup>(339)</sup>.

Para evitar este problema, se han desarrollado diferentes métodos estadísticos o correcciones. Una de las correcciones por test múltiples más comunes es la corrección de Bonferroni y consiste en dividir el nivel de significación (i.e. alfa) por el número de tests analizados. Esta corrección es muy conservadora y, en estudios con un gran número de variables como los GWAS, puede dar lugar a numerosos falsos negativos. Por este motivo, muchos estudios GWAS han optado por seleccionar los SNPs más significativos (aunque no superen la corrección de Bonferroni) y han llevado a cabo un estudio de replicación. En el estudio de replicación una o varias cohortes independientes de individuos son utilizadas para validar la asociación original. En este caso, y dado el bajo número de SNPs, la probabilidad de validar la asociación original es muy superior<sup>(339, 313)</sup>.

Cuando se efectúa más de un contraste estadístico en el análisis de los datos, el criterio aplicado por la mayoría de los investigadores es el de "ajustar" o "corregir" el nivel de significación (inicialmente  $P < 5E-02$ ) dependiendo del número de contrastes efectuado. En nuestro estudio hemos utilizado este método para definir las asociaciones estadísticamente significativas.

### Softwares de análisis utilizado

El programa informático utilizado para el análisis de asociación entre los SNPs y la respuesta fue *PLINK* versión 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/download.shtml>). *PLINK* es un *software* de análisis genómico de código abierto que permite llevar a cabo múltiples análisis asociados a los estudios GWAS.

PLINK permite llevar a cabo diferentes análisis de control de calidad, estratificación y asociación estadística. A su vez, está programado en el lenguaje C++ lo que le confiere la rapidez de cálculo necesaria para los estudios GWA <sup>(338)</sup>.

La imputación de genotipos se realizó con el programa *MACH* 1.0 ([www.Markov Chain Haplotyping algorithm](http://www.MarkovChainHaplotypingalgorithm.com)). El método utilizado por este *software* se basa en un modelo de Markov para fasear e imputar genotipos a partir de un panel de haplotipos de referencia. Iterativamente, el programa va actualizando para cada muestra las probabilidades de cada uno de los genotipos ausentes, utilizando una estimación de sus haplotipos en función de los de referencia. Para esta imputación se utilizó el panel de referencia de muestras HapMap de origen europeo (*Hapmap2 CEU r22*) y 100 iteraciones <sup>(341)</sup>.

Para aplicar el análisis GSEA se ha utilizado la versión de Wang et al. ([www.open-bioinformatics.org/gengen](http://www.open-bioinformatics.org/gengen)) conjuntamente con dos sets de vías génicas: *Pathway-Commons* ([www.pathwaycommons.org](http://www.pathwaycommons.org); Octubre 2011) y *Reactome* ([www.reactome.org](http://www.reactome.org); versión 41). Se realizaron dos análisis diferentes, el primero utilizando los valores de asociación obtenidos con la respuesta EULAR ( $\chi^2$ ) y el segundo con los obtenidos a partir del análisis de regresión utilizando el  $\Delta$ DAS28 como respuesta y el DAS28 (SB) como covariable. A cada gen se le mapearon las SNPs a menos de 50kb de distancia y se excluyeron aquellas vías génicas con menos de 10 o más de 300 genes. Finalmente se procedió al análisis tal y como se describe en el estudio publicado por Wang et al. <sup>(342)</sup> aplicando 1,000 iteraciones para el cálculo de los estadísticos de asociación y se elaboró una lista de vías génicas potencialmente asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

#### 4.3.- Replicación de *loci* asociados a la respuesta identificados en este estudio y publicados anteriormente

El desafío de los estudios de GWAS es identificar los resultados verdaderos positivos de un gran número de falsos positivos. Para este objetivo suele emplearse un estudio adicional de replicación de las señales de asociación más fuertes utilizando una cohorte independiente <sup>(343,344,345)</sup>.

El pequeño tamaño muestral es el problema más frecuente en los estudios de asociación genética y puede dar lugar a un insuficiente poder de replicación. En nuestro estudio hemos calculado el poder de replicación de los SNPs candidatos seleccionados siguiendo las consideraciones comentadas anteriormente y se realizó el cálculo del poder para una muestra de 267 pacientes (cohorte de pacientes con terapia anti-TNF $\alpha$  disponible actualmente para replicación) y 564 pacientes (el doble de la cohorte disponible), a fin de definir la población más adecuada para el estudio de replicación que realizaremos en un proyecto futuro. A partir de esta evaluación del poder estadístico, se seleccionaron los SNPs candidatos para replicación. En la actualidad se considera que sólo deberían ser analizados aquellos SNPs cuyo poder de replicación estimado sea superior al 80%.

Al igual que con el estudio de los biomarcadores clínicos se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura sobre los SNPs anteriormente publicados como SNPs candidatos asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la AR <sup>(230, 270, 290, 292, 324, 325)</sup> con el objetivo de validar estos hallazgos.

Se seleccionaron los SNPs candidatos de los 3 estudios GWAS publicados previamente y comentados en la introducción, además de los SNPs analizados en dos estudios de genes candidatos que evaluaban los SNPs asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Para la replicación de estos SNPs se realizó el estudio de asociación utilizando los dos modelos utilizados en el análisis de nuestro estudio de GWAS. Los SNPs que resultaron significativos en el análisis con el  $\Delta$ DAS28 y/o la respuesta clínica EULAR, se re-analizaron utilizando la misma estrategia que en el estudio original, a fin de confirmar la asociación. El valor de  $P$  considerado como punto de corte para la significación estadística fue el resultado de la corrección Bonferroni específica en cada estudio.

#### 4.3.1.- Imputación

Existen más de 10 millones de SNPs, por lo que actualmente los estudios GWAS solo examinan una fracción de estas. La existencia de DL y la caracterización exhaustiva de genomas de referencia por el proyecto *HapMap* han permitido el desarrollo de técnicas estadísticas de imputación. La imputación es el término utilizado para describir el proceso de estimar el genotipo de SNPs que no han sido directamente genotipadas en el estudio. Estas técnicas se han demostrado muy robustas y permiten aumentar el poder de cribado de los GWAS y, consecuentemente, aumentar la probabilidad de identificar SNPs asociadas al rasgo de interés <sup>(346, 347)</sup>.

En este proyecto de tesis se utilizó la imputación específicamente para la validación de ciertos SNPs asociados a la respuesta, que estuvieran ausentes en nuestra plataforma de genotipado, identificados en otros estudios previamente publicados. El punto de corte utilizado para definir la significación de las asociaciones entre los SNPs y la respuesta, fue de  $P < 5E-02$  con la respectiva corrección de Bonferroni.

La imputación fue utilizada para la identificación de los SNPs asociados con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  no disponibles en nuestro chip publicados en el estudio de GWA de Plant et al, que utilizó la plataforma *Affymetrix GeneChip* y para ciertos SNPs identificados en los estudios de SNPs candidatos publicados por Cui et al <sup>(230)</sup> y Potter et al <sup>(292)</sup>.



---

# RESULTADOS

---

## 1.- Análisis global de la cohorte

En el proyecto PSE IMID-Kit se incluyeron 2.310 pacientes con AR procedentes de 13 Servicios de Reumatología de diferentes hospitales universitarios españoles. A partir de esta cohorte en el presente proyecto de tesis doctoral se incluyeron 628 pacientes con AR que habían recibido tratamiento con terapia anti-TNF $\alpha$ . La obtención de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas se realizó por medio de los cuestionarios epidemiológicos y clínicos específicos para la AR anteriormente descritos. En el conjunto global de pacientes del proyecto PSE IMID-Kit a través de las medidas de seguimiento y control de calidad previamente descritos se consiguió un 90% de cumplimentación de los diferentes cuestionarios clínicos y epidemiológicos.

En la tabla siguiente se observa el porcentaje de cumplimentación de cada una de las variables que han sido analizadas en el presente proyecto.

**Tabla 21.** Cumplimentación de las variables incluidas en el estudio

<b>Variables del cuestionario epidemiológico*</b>	<b>Datos cumplimentados</b>
<b>Género</b>	628/628 (100%)
<b>Nivel de estudios</b>	581/628 (92%)
<b>Tabaco</b>	598/628 (95%)
<b>Consumo de alcohol</b>	609/628 (97%)
<b>Variables del cuestionario clínico-AR *</b>	
<b>FR</b>	625/628 (99%)
<b>Anti-CCP</b>	592/628 (94%)
<b>Años de evolución de la enfermedad previos al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	628/628 (100%)
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	609/628 (97%)
<b>Nº de FAMES previos a la inclusión en el estudio</b>	627/628 (99%)
<b>Nº de comorbilidades previas a la inclusión en el estudio</b>	627/628 (99%)
<b>DAS28 (SB)</b>	628/628 (100%)
<b>DAS28 (S12)</b>	628/628 (100%)
<b>Tipo de tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	628/628 (100%)

\* Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad.

Las características epidemiológicas, clínicas y serológicas de los pacientes incluidos en este estudio se describen en la tabla 22.

**Tabla 22.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas de la cohorte a estudio

Variables*		n (%)
<b>Género</b>	Masculino	106/628 (17%)
	Femenino	522/628 (83%)
<b>Nivel de estudios</b>	Básico	354/581 (61%)
	Medio/Alto	227/581 (39%)
<b>Tabaco</b>	Fumador activo	156/598 (26%)
	Exfumador	109/598 (18%)
	No Fumador	333/598 (56%)
<b>Consumo de Alcohol</b>	Si	450/609 (74%)
	No	159/609 (26%)
<b>Tratamiento</b>	Infliximab	218/628 (35%)
	Etanercept	251/628 (40%)
	Adalimumab	159/628 (25%)
<b>Autoanticuerpos</b>	FR positivo	489/625 (78%)
	Anti-CCP positivo	431/592 (73%)
<b>N° de FAMES previos <math>\geq 2</math></b>		295/627 (47%)
<b>N° de comorbilidades previas <math>\geq 2</math></b>		94/627 (15%)
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>		9,4 $\pm$ 7,8
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		52,9 $\pm$ 12
<b>DAS28 (SB)</b>		5,5 $\pm$ 1,1
<b>DAS28 (S12)</b>		3,9 $\pm$ 1,4
<b><math>\Delta</math>DAS28</b>		1,6 $\pm$ 1,3

\* Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE.

La media de la edad de los pacientes al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  fue de 52 $\pm$ 12 años, 17% de los pacientes fueron del género masculino y 83% del género femenino con una ratio de 1:5. En relación al consumo de tabaco al inicio del tra-

tamiento anti-TNF $\alpha$  se observó que de un total de 598 pacientes, 156 pacientes (26%), eran fumadores activos y 333 pacientes (56%) eran no fumadores. El antecedente de consumo de alcohol previo a la inclusión en el estudio se objetivó en 450 pacientes de un total de 609 (74%).

Los resultados relativos al nivel de estudios y a la presencia de otras enfermedades concomitantes se presentan en la tabla 2.

El valor de la media del tiempo de evolución de la enfermedad y de la edad al inicio del tratamiento fueron de  $9,4 \pm 7,8$  y  $52,9 \pm 12$ , respectivamente. Se observó que de un total de 625 pacientes, 489 pacientes (78%) tenían el FR positivo y de 592 pacientes un 73% eran positivos para los anticuerpos anti-CCP. En relación a la presencia de ambos anticuerpos, 373 pacientes (62%) presentaban ambos anticuerpos positivos al mismo tiempo. En contraposición solo 71 (11,5%) tenían ambos anticuerpos negativos en el momento del estudio.

En relación al tratamiento anti-TNF $\alpha$  se observó que el tratamiento más utilizado en primera línea fue el ETA en 251 pacientes, seguido por el tratamiento con IFX en 218 pacientes y con adalimumab en 159 pacientes. Los valores de la media del índice DAS28 a la semana basal y a la semana 12 del tratamiento, así como el valor de la media del  $\Delta$ DAS28 se describen en dicha tabla.

## 2.- Análisis en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Las características epidemiológicas, clínicas y serológicas de los pacientes incluidos en este estudio en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$  se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 23.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Variables		IFX (%)	ETA (%)	ADA (%)	P
Género	Masculino	33/218 (15%)	46/251 (18%)	27/159 (17%)	0,85
	Femenino	185/218 (85%)	205/251 (82%)	132/159 (83%)	
Nivel de estudios	Básico	117/202 (58%)	144/234 (62%)	93/145 (64%)	0,49
	Medio/Alto	85/202 (42%)	90/234 (38%)	52/145 (36%)	
Tabaco	Fumador/ Exfumador	89/209 (43%)	106/239 (44%)	69/149 (46%)	0,78
	No Fumador	120/209 (57%)	136/239 (56%)	80/149 (54%)	
Consumo de Alcohol	Si	153/211 (73%)	187/245 (76%)	110/153 (72%)	0,53
	No	58/211 (27%)	58/245 (24%)	43/153 (28%)	
FR	+	162/218 (74%)	201/250 (80%)	126/157 (80%)	0,22
	-	56/218 (26%)	49/250 (20%)	31/157 (20%)	
anti-CCP	+	150/205 (73%)	163/238 (68%)	118/149 (79%)	0,07
	-	55/205 (27%)	75/238 (32%)	31/149 (21%)	
Edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$		51,9 $\pm$ 11	52,7 $\pm$ 12,9	54,7 $\pm$ 11,3	0,07
Años de evolución de la enfermedad		9,2 $\pm$ 6,6	9,6 $\pm$ 8,2	9,3 $\pm$ 8,8	0,87
Nº de FAMES previos		2,8 $\pm$ 1,7	2,4 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 1,4	3,48E-06
Nº de comorbilidades previas		0,6 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,9	0,87
DAS28 (SB)		5,8 $\pm$ 1,2	5,5 $\pm$ 1,2	5,2 $\pm$ 1,0	1,6E-05

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología. **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE. Para la comparación de las variables dicotómicas se utilizó el test de  $\chi^2$  y para las continuas se utilizó el test de ANOVA.

En relación a las características epidemiológicas (i.e.género, nivel de educación, hábito tabáquico y consumo de alcohol) los resultados fueron similares en los tres grupos de tratamiento.

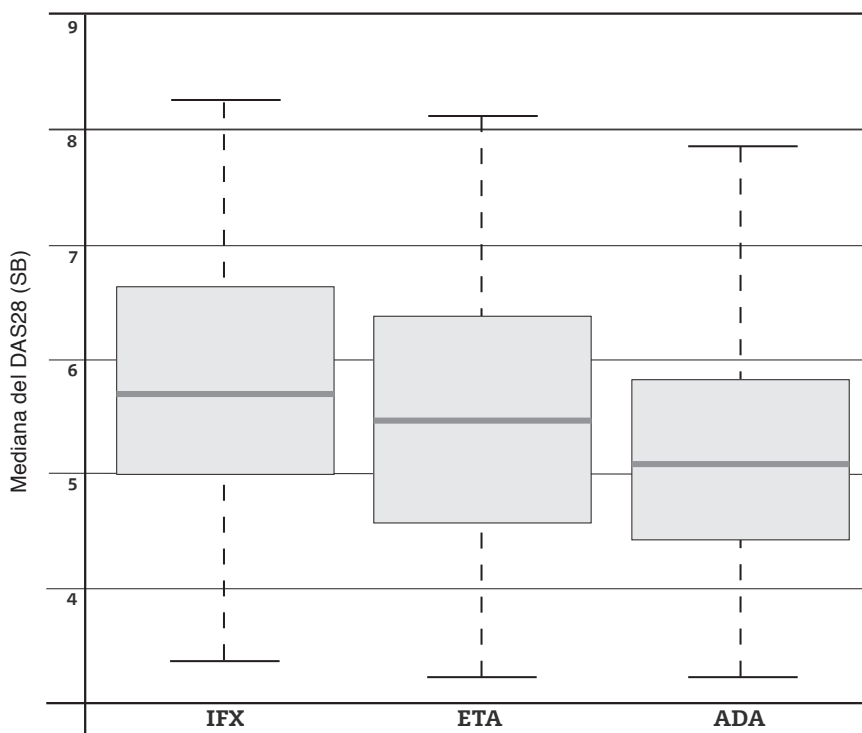
El valor de la media de los años de evolución de la enfermedad y de la edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  y los resultados relativos a las comorbilidades se observan en la tabla 3.

El porcentaje de pacientes con FR positivo y negativo fue similar en los tres grupos de tratamiento, al igual que el porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos y negativos.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de las medias del número de FAMES previos entre los tres tratamientos anti-TNF $\alpha$  ( $P=3,48E-06$ ).

En relación al DAS28 (SB) se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P=1,6E-05$ ) al comparar las medias de los tres grupos de tratamiento. Los pacientes tratados con IFX presentaron un valor de la media del DAS28 (SB) más elevado en comparación con los pacientes que recibieron los otros tratamientos. A diferencia de los pacientes tratados con ADA presentaron un valor de la media del DAS28 (SB) más bajo en comparación con los otros tratamientos, tal y como se observa en el gráfico 5.

**Gráfico 5.** DAS28 a la semana basal en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$



En el gráfico *box-plot*, la línea del centro de cada rectángulo representa la mediana. Las líneas superior e inferior representan el tercer cuartil y el primer cuartil. Los extremos de las líneas que salen de la caja son los valores que delimitan el 95% central de los datos. En este gráfico se puede observar que la mediana del DAS28 (SB) de los pacientes tratados con IFX era superior que la de los pacientes con los otros tratamientos.

### 3.- Análisis de los biomarcadores no genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

#### 3.1.- Biomarcadores no genéticos de respuesta

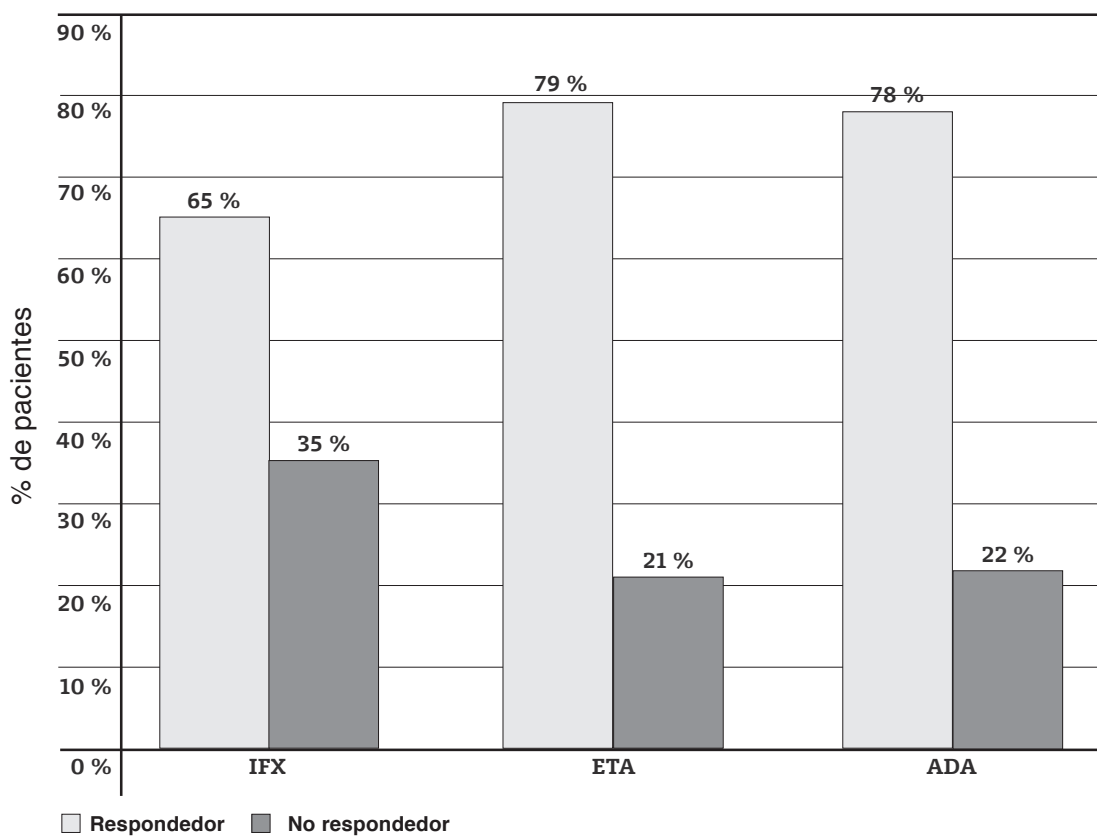
Utilizando los criterios que se han descrito previamente, se observó que 464 pacientes (74%) cumplían el criterio de respondedor (i.e. bueno y moderado) y 164 pacientes (26%) cumplían el criterio de no respondedor a la semana 12 del inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Entre los pacientes respondedores se objetivó que 199 pacientes (43%) fueron tratados con ETA, 124 pacientes (27%) con ADA y 141 pacientes (30%) con IFX, observándose un predominio de pacientes respondedores tratados con ETA ( $P=2,3E-02$ ). Entre los pacientes que no alcanzaron la respuesta clínica se observó que 77 pacientes (47%) fueron tratados con IFX, 52 pacientes (32%) con ETA y 35 pacientes (21%) con ADA observándose un predominio de pacientes no respondedores tratados con IFX ( $P=1,2E-03$ ), tal y como se observa en la tabla 24.

**Tabla 24.** Respuesta clínica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Tratamiento	Respondedor	No Respondedor	P	OR	IC95%
Infliximab (%)	141/218 (65 %)	77/218 (35%)	1,2E-03	1,93	1,30-2,88
Etanercept (%)	199/251 (79 %)	52/251 (21%)	2,3E-02	0,62	0,41-0,93
Adalimumab (%)	124/159 (78 %)	35/159 (22%)	3,2E-01	0,79	0,49-1,26

Los valores de  $P$  son resultado del análisis univariante, **OR** = odds ratio estimado a la no respuesta

En relación a la respuesta observada en cada grupo de tratamiento, el 79% de los pacientes tratados con ETA fueron respondedores y el 21% de los pacientes fueron no respondedores. En el grupo tratado con IFX el 65% de los pacientes fueron respondedores y el 35% fueron no respondedores. Los porcentajes de pacientes respondedores y no respondedores del grupo de pacientes tratados con ADA se observa en el gráfico 6.

**Gráfico 6.** Respuesta clínica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

### 3.1.1.-Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la respuesta

En la tabla 25 se observan las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas del grupo de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

En el grupo de respondedores, 380 pacientes (82%) fueron de género femenino y 84 pacientes (18%) de género masculino. El 42 % de estos pacientes tenían un nivel de estudio medio-alto y el 58% de los pacientes un nivel de estudio básico. En este grupo de pacientes, 206 pacientes (46%) eran fumadores o exfumadores al inicio de la terapia anti-TNF $\alpha$ , mientras que 236 pacientes (54%) eran no fumadores. El consumo de alcohol fue positivo en el 73% de los pacientes en el grupo de los pacientes respondedores.

En relación a las variables clínicas del grupo respondedor, el valor de la media de la edad y de los años de evolución al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  fue de 52,8  $\pm$ 12 y de 9,5 $\pm$ 8, respectivamente. El valor de la media del DAS28 (SB) de los pacientes respondedores fue de 5,5  $\pm$ 1,1. Los resultados relativos al número de FAMES, de comorbilidades y a las características serológicas se observan en la tabla 25.



**Tabla 25.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas en función de la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

Variables*		Respondedor	No Respondedor	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)
Género (%)	Masculino	84/106 (79 %)	22/106 (21 %)	1,7E-01 0,70 (0,42-1,16)	5,9E-01 0,84 (0,45-1,57)
	Femenino	380/522 (73 %)	142/522 (27 %)		
Nivel de estudios (%)	Básico	249/354 (70 %)	105/354 (30 %)	8,6E-03 0,59 (0,39-0,87)	3,4E-02 0,61 (0,38-0,96)
	Medio/Alto	182/227 (80 %)	45/227 (20 %)		
Tabaco (%)	Fumador/ Exfumador	206/265 (78 %)	59/265 (22 %)	6,2E-02 1,43 (0,98-2,08)	4,9E-01 1,18 (0,73-1,90)
	No Fumador	236/333 (71 %)	97/333 (29 %)		
Consumo de Alcohol (%)	Si	327/450 (73 %)	123/450 (27 %)	2,5E-01 1,29 (0,84-1,97)	4,9E-01 1,19 (0,73-1,93)
	No	123/159 (77 %)	36/159 (23 %)		
FR (%)	Positivo	358/489 (73 %)	131/489 (27 %)	4,4E-01 1,19 (0,76-1,85)	3,5E-01 1,28 (0,76-2,17)
	Negativo	104/136 (76 %)	32/136 (24 %)		
Anti-CCP (%)	Positivo	316/431 (73 %)	115/431 (27 %)	3,6E-01 1,22 (0,80-1,86)	3,3E-01 1,28 (0,78-2,09)
	Negativo	124/161 (77 %)	37/161 (30 %)		
Edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$		52,8 $\pm$ 12	53,1 $\pm$ 11	7,4E-01 1,00 (0,99-1,02)	4,9E-01 0,99 (0,97-1,01)
Años de evolución de la enfermedad		9,5 $\pm$ 8	9,3 $\pm$ 7,4	7,9E-01 1,00 (0,97-1,02)	1,8E-01 0,98 (0,95-1,01)
N° de FAMES previos		2,37 $\pm$ 1,6	2,76 $\pm$ 1,6	9,9E-03 1,15 (1,03-1,28)	2,0E-02 1,17 (1,02-1,33)
N° de comorbilidades previas		0,58 $\pm$ 0,9	0,64 $\pm$ 0,9	4,6E-01 1,07 (0,89-1,30)	7,6E-01 1,04 (0,82-1,30)
DAS28 (SB)		5,5 $\pm$ 1,1	5,4 $\pm$ 1,2	5,0E-01 0,95 (0,81-1,11)	5,4E-02 0,84 (0,70-1,00)

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología. **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE. Los valores de P son resultados del análisis realizado con el test de regresión logística univariante y multivariante. **OR** = odds ratio estimado a la no respuesta.

En el grupo de pacientes no respondedores 142 pacientes (87%) eran de género femenino y 22 pacientes (13%) eran de género masculino. El 30 % de estos pacientes tenían un nivel de estudio medio-alto y el 70% de los pacientes un nivel educativo básico. El 38% de los pacientes eran fumadores o exfumadores al inicio de la terapia anti-TNF $\alpha$ , mientras que el 62% nunca había fumado. El consumo de alcohol fue positivo en el 77% de los pacientes del grupo de pacientes no respondedores.

El valor de la media de la edad y de los años de evolución al inicio de la terapia biológica fue  $53,1 \pm 11$  y de  $9,3 \pm 7,4$ , respectivamente. El valor de la media del índice DAS28 (SB) fue de  $5,4 \pm 1,2$ . Los resultados relativos al número de FAMES, de comorbilidades y de autoanticuerpos se observan en la Tabla 25.

En relación a las variables epidemiológicas se observó que el nivel de estudios medio-alto se asociaba de forma significativa con la respuesta clínica tanto en el análisis univariante ( $P=8.6E-03$ , OR (IC95%)=0,59 (0,39-0,87)) como en el multivariante ( $P=3,4E-02$ , OR (IC95%)=0,61 (0,38-0,96)). No se observó ninguna asociación significativa entre las otras variables epidemiológicas y la respuesta clínica.

Entre las variables clínicas, se objetivó que el número de FAMES previos estaba asociado de forma inversa con la respuesta tanto en el análisis univariante ( $P=9,9E-03$ , OR (IC95%)=1,15 (1,03-1,28)) como en el análisis multivariante ( $P=2,0E-02$ , OR (IC95%)=1,17 (1,02-1,33)). Tal y como se observa en la tabla 25 ninguna de las otras variables clínicas o serológicas estuvo asociada con la respuesta al tratamiento.

### **3.1.2.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la respuesta en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$**

Las características epidemiológicas, clínicas y serológicas según el tratamiento anti-TNF $\alpha$  se observan en la tabla 26 y la asociación de éstas con la respuesta clínica se observan en la tabla 27. En relación al hábito tabáquico, en el grupo de pacientes tratados con ETA, se observó una asociación significativa entre los pacientes no fumadores y el grupo de pacientes no respondedores, pero solo en el análisis univariante ( $P=1,0E-02$ , OR (IC 95%) 2,44 (1,24-4,81)). Evaluando esta asociación y controlando por cada una de las demás covariables, se pudo determinar que las variables de confusión de esta asociación eran el género y los anticuerpos anti-CCP. Utilizando ambas variables en el modelo de regresión logística la significación de la asociación con el hábito tabáquico desapareció.

El nivel de estudios medio-alto se asoció de forma significativa a la respuesta en el grupo de pacientes tratados con ETA en el análisis univariante ( $P=1,1E-02$ , OR (IC95%)=0,39 (0,19-0,81)) y esta asociación se mantuvo al incorporar las demás covariables en el análisis multivariante ( $P=4,1E-02$ , OR (IC95%) 0,40 (0,16-0,96)).

En el análisis univariante y multivariante, el género y el consumo de alcohol no se asociaron a la respuesta clínica, en ninguno de los tres grupos de tratamiento, tal y como se observa en la tabla 27.

En relación a las variables serológicas, se observó que en el grupo de pacientes tratado con IFX, el FR positivo se asoció al grupo de pacientes no respondedores tanto en el análisis univariante ( $P=5,5E-03$ , OR (IC95%)=2,81 (1,36-5,84)) como en el multivariante ( $P=3.8E-03$ , OR (IC95%)=3,63 (1,52-8,67)). Los pacientes tratados con ADA y que presentaban anticuerpos anti-CCP positivos presentaron una peor respuesta clínica en comparación con los pacientes con anti-CCP negativos en el análisis multivariante ( $P=2,6E-02$ , OR (IC95%)=6,36 (1,25-32,37)).

En el grupo de pacientes tratados con IFX se observó una asociación inversa entre el número de FAMES previos y la respuesta clínica, aunque la magnitud de esta asociación fue mínima y solo se observó en el análisis univariante ( $P=4,0E-02$ , OR (IC95%) 1,19 (1,01-1,39)).

Los resultados relativos a los años de evolución y en la edad de los pacientes al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  se observan en la tabla 27.

En el análisis multivariante se observó que el índice DAS28 (SB) presentaba una asociación con la respuesta ( $P=1,9E-02$ , OR (IC95%) 0,55 (0,33-0,91)) pero solo en el grupo de pacientes tratados con ADA.

**Tabla 26.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas en relación a la respuesta según el tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

VARIABLE	INFLIXIMAB		ETANERCEPT		ADALIMUMAB		
	Respondedor	No respondedor	Respondedor	No respondedor	Respondedor	No respondedor	
Género	Masculino	20/33 (61 %)	41/46 (89 %)	5 /46 (11 %)	23/27 (85 %)	4/27 (15 %)	
	Femenino	121/185 (65 %)	64/185 (35 %)	158/205 (77 %)	47/205 (23 %)	101/132 (76 %)	31/132 (24 %)
Nivel de estudios	Básico	73/117 (62 %)	44/117 (38 %)	106/144 (74 %)	38/144 (26 %)	70/93 (75 %)	23/93 (25 %)
	Medio-alto	60/85 (71 %)	25/85 (29 %)	79/90 (88 %)	11/90 (12 %)	43/113 (83 %)	9/113 (17 %)
Tabaco	Fumador/ Exfumador	55/89 (62 %)	34/89 (38 %)	92/106 (87 %)	14/106 (13 %)	58/69 (84 %)	11/69 (16 %)
	No fumador	80/130 (61 %)	50/130 (39 %)	97/133 (73 %)	36/133 (27 %)	59/80 (74 %)	21/80 (26 %)
Consumo de Alcohol	Positivo	102/153 (67 %)	51/153 (33 %)	144/187 (77 %)	43/187 (23 %)	81/110 (74 %)	29/110 (26 %)
	Negativo	35/58 (60 %)	23/58 (40 %)	51/58 (88 %)	7/58 (12 %)	37/43 (86 %)	6/43 (14 %)
FR	Positivo	96 /162 (59 %)	66/162 (41 %)	163/201 (81 %)	38/201 (19 %)	99/ 126 (79 %)	27/126 (21 %)
	Negativo	45/56 (80 %)	11/56 (20 %)	36/49 (73 %)	13/49 (26 %)	23/31 (74 %)	8/31 (26 %)
Anti-CCP	Positivo	98/150 (65 %)	52/150 (35 %)	131/163 (80 %)	32/163 (20 %)	87/118 (74 %)	31/118 (26 %)
	Negativo	36/55 (66 %)	19/55 (34 %)	60/75 (80 %)	15/75 (20 %)	28/31 (90 %)	3/31 (10 %)
Edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$		51,03 $\pm$ 11,7	53,42 $\pm$ 9,8	52,53 $\pm$ 13,2	53,32 $\pm$ 11,9	55,36 $\pm$ 10,5	52,5 $\pm$ 13,6
Años de evolución de la enfermedad		9,60 $\pm$ 6,9	8,67 $\pm$ 6	9,2 $\pm$ 7,9	11,2 $\pm$ 9,3	9,7 $\pm$ 9,3	7,8 $\pm$ 6,7
Nº de FAMES previos		2,67 $\pm$ 1,7	3,18 $\pm$ 1,6	2,37 $\pm$ 1,6	2,75 $\pm$ 1,6	2,03 $\pm$ 1,5	1,86 $\pm$ 1,3
Nº de comorbilidades previas		0,55 $\pm$ 0,8	0,74 $\pm$ 0,9	0,55 $\pm$ 0,8	0,65 $\pm$ 0,9	0,65 $\pm$ 1	0,40 $\pm$ 6,9
DAS28 (SB)		5,86 $\pm$ 1,1	5,62 $\pm$ 1,3	5,54 $\pm$ 1,1	5,6 $\pm$ 1,3	5,25 $\pm$ 1	5,04 $\pm$ 1

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología, **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE.

**Tabla 27.** Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la respuesta en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

VARIABLE*	INFLIXIMAB		ETANERCEPT		ADALIMUMAB	
	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)
<b>Género</b>	6,0E-01 1,23 (0,57-2,63)	5,5E-01 0,74 (0,28-1,99)	7,6E-02 0,41 (0,15-1,10)	4,2E-01 0,61 (0,18-2,04)	3,3E-01 0,57 (0,18-1,76)	8,4E-01 1,16 (0,28-4,81)
<b>Nivel de estudios</b>	2,3E-01 0,69 (0,38-1,26)	3,0E-01 0,68 (0,33-1,41)	1,1E-02 0,39 (0,19-0,81)	4,1E-02 0,40 (0,16-0,96)	3,0E-01 0,64 (0,27-1,50)	2,6E-01 0,55 (0,20-1,55)
<b>Tabaco</b>	4,7E-01 0,81 (0,46-1,43)	9,9E-01 1,00 (0,47-2,12)	1,0E-02 2,44 (1,24-4,81)	5,1E-01 1,34 (0,56-3,22)	1,3E-01 1,88 (0,83-4,24)	3,3E-01 1,75 (0,57-5,38)
<b>Consumo de Alcohol</b>	3,9E-01 0,76 (0,41-1,42)	3,5E-01 0,70 (0,32-1,50)	7,7E-02 2,18 (0,92-5,14)	2,6E-01 1,77 (0,66-4,80)	1,1E-01 2,21 (0,84-5,77)	4,5E-01 1,55 (0,50-4,85)
<b>FR</b>	5,5E-03 2,81 (1,36-5,84)	3,8E-03 3,63 (1,52-8,67)	2,4E-01 0,65 (0,31-1,33)	2,8E-01 0,61 (0,25-1,50)	6,0E-01 0,78 (0,32-1,95)	5,6E-01 0,70 (0,22-2,28)
<b>Anti-CCP</b>	9,9E-01 1,01 (0,53-1,93)	4,2E-01 0,72 (0,33-1,59)	9,5E-01 0,98 (0,49-1,94)	4,5E-01 1,37 (0,60-3,14)	6,1E-02 3,33 (0,94-11,71)	2,6E-02 6,36 (1,25-32,37)
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	1,4E-01 1,02 (0,99-1,05)	1,5E-01 1,02 (0,99-1,06)	7,0E-01 1,00 (0,98-1,03)	2,2E-01 0,98 (0,95-1,01)	1,9E-01 0,98 (0,95-1,01)	2,7E-01 0,97 (0,93-1,02)
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>	3,2E-01 0,98 (0,94-1,02)	1,8E-01 0,96 (0,91-1,02)	1,3E-01 1,03 (0,99-1,06)	8,0E-01 1,01 (0,96-1,05)	2,5E-01 0,97 (0,93-1,02)	3,6E-01 0,97 (0,91-1,04)
<b>Nº de FAMES previos</b>	4,0E-02 1,19 (1,01-1,39)	8,6E-02 1,20 (0,97-1,47)	1,4E-01 1,15 (0,96-1,38)	4,4E-01 1,09 (0,87-1,37)	5,3E-01 0,92 (0,70-1,20)	9,8E-01 1,00 (0,70-1,44)
<b>Nº de comorbidades previas</b>	1,5E-01 1,24 (0,92-1,67)	8,8E-01 1,03 (0,70-1,52)	4,6E-01 1,13 (0,81-1,58)	4,9E-01 1,15 (0,77-1,73)	1,7E-01 0,70 (0,42-1,16)	8,7E-01 0,95 (0,53-1,71)
<b>DAS28 (SB)</b>	1,5E-01 0,84 (0,66-1,07)	6,3E-02 0,75 (0,55-1,02)	7,6E-01 1,04 (0,81-1,34)	8,7E-01 0,98 (0,72-1,31)	3,0E-01 0,82 (0,56-1,19)	1,9E-02 0,55 (0,33-0,91)

\* Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología, **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Los valores de P son resultados del análisis realizado con el test de regresión logística univariante y multivariante. **OR** = odds ratio estimado a la no respuesta.

Utilizando los criterios que se han descrito previamente, se observó que de 628 pacientes, 127 (20%) alcanzaron la remisión y 501 pacientes (80%) no alcanzaron la remisión a la semana 12 de tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Entre los pacientes que alcanzaron la remisión se objetivó que 67 pacientes (53%) eran tratados con ETA, 37 pacientes (29%) con ADA y 23 pacientes (18%) con IFX, observándose un predominio de pacientes en remisión tratados con ETA ( $P=3,5E-03$ ). Entre los pacientes que no alcanzaron la remisión se observó que 195 pacientes (39%) eran tratados con IFX, 184 pacientes (37%) con ETA y 122 pacientes (24%) con ADA observándose un predominio de pacientes tratados con IFX ( $P=9,7E-05$ ) tal y como se observa en la tabla 28.

**Tabla 28.** Remisión clínica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Tratamiento	Remisión	No Remisión	P	OR	IC95%
Infliximab	23/218 (10,5%)	195/218 (89,4%)	9,7E-05	2,89	1,69-4,93
Etanercept	67/251 (26,7%)	184/251 (73,3%)	3,5E-03	0,53	0,34-0,81
Adalimumab	37/159 (23,3%)	122/159 (76,7,4%)	2,8E-01	0,77	0,47-1,24

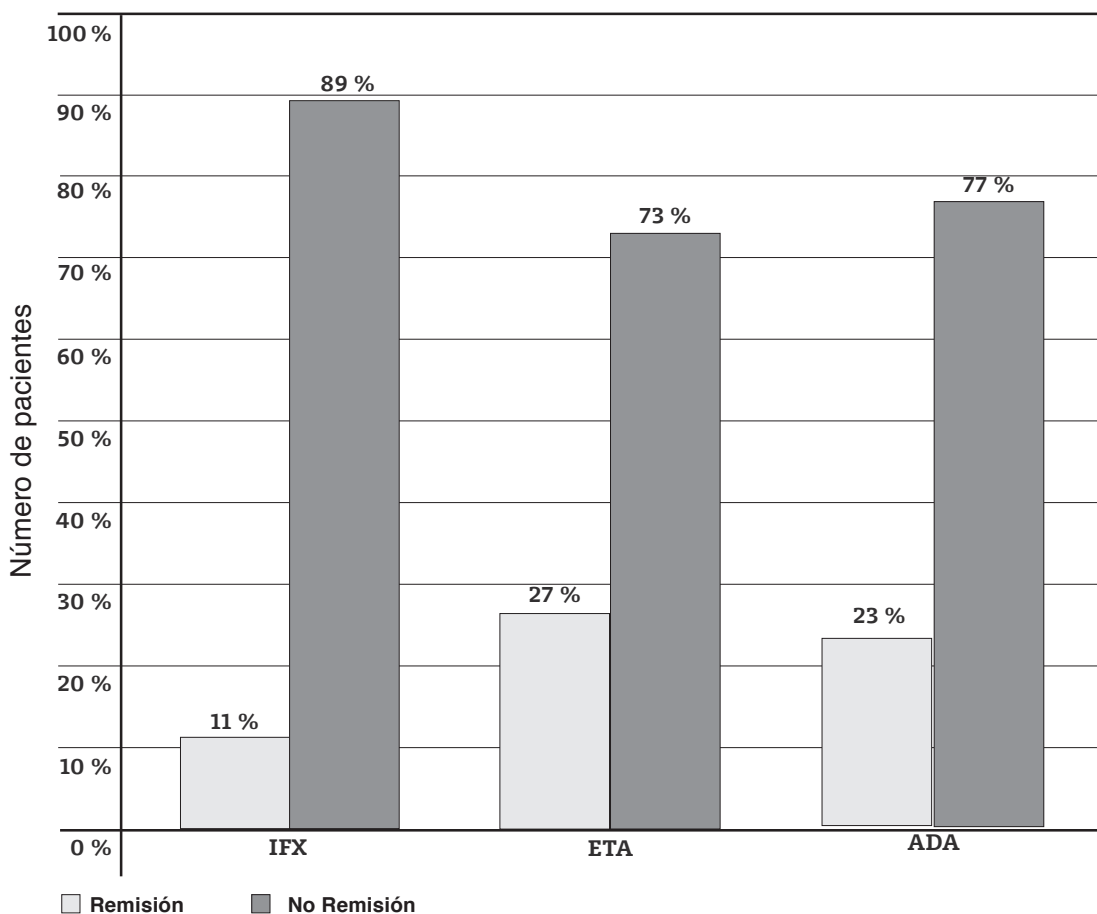
Los valores de  $P$  son resultado del análisis univariante, **OR** = odds ratio estimado a la no respuesta

En relación a la remisión clínica según el tratamiento anti-TNF $\alpha$ , se observó que 67 pacientes (27%) tratados con ETA, 37 pacientes (23%) con ADA y 23 pacientes (18%) con IFX alcanzaron la remisión a la semana 12 de tratamiento, tal y como se observa en el gráfico 7.

### 3.2.1.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la remisión

En la tabla 29 se observan las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas de los pacientes que alcanzan o no la remisión a las 12 semanas de tratamiento.

Entre los pacientes que alcanzaron la remisión 29 pacientes (23%) fueron de género masculino y 98 pacientes (77%) de género femenino. El 49 % de estos pacientes tenían un nivel de estudios medio-alto y el 51% de los pacientes de un nivel de estudios básico. En relación al hábito tabáquico, 64 pacientes (54%) eran fumadores o ex fumadores al iniciar la terapia anti-TNF $\alpha$ , mientras que 54 pacientes (46%) nunca habían fumado. El consumo de alcohol fue positivo en el 72% de los pacientes que alcanzaron la remisión.

**Gráfico 7.** Remisión clínica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

En relación a las variables clínicas de los pacientes que alcanzaron la remisión, el valor de la media de la edad y de los años de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  fue de  $52,28 \pm 12,6$  y  $9,3 \pm 7,8$  años, respectivamente. El valor de la media del DAS28 (SB) fue de  $4,83 \pm 0,97$ .

Los resultados relativos al número de FAMES, de comorbilidades y a las características serológicas se observan en la Tabla 29.

En la cohorte estudiada, 501 pacientes (80%) no alcanzaron la remisión. De estos 424 pacientes (85%) eran de género femenino y 77 pacientes (15%) de género masculino. El 42% de los pacientes eran fumadores o exfumadores al inicio de la terapia anti-TNF $\alpha$ , mientras que el 58% de los pacientes no eran fumadores. El consumo de alcohol fue positivo en el 74% de los pacientes que no alcanzaron la remisión.

El valor de la media de la edad y de los años de evolución de la enfermedad al inicio de la terapia biológica era de  $53,08 \pm 11,8$  y  $9,4 \pm 7,9$  años respectivamente. El valor medio del DAS28 (SB) fue de  $5,72 \pm 1,14$ . Los resultados relativos al número de FAMES y de comorbilidades, y a las características serológicas se observan en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas en función de la remisión al tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

Variables*		Remisión	No Remisión	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)
Género	Masculino	29/106 (27 %)	77/106 (73 %)	4,6E-02 0,61 (0,38-0,99)	9,1E-01 0,96 (0,51-1,83)
	Femenino	98/522 (19 %)	424/522 (81 %)		
Nivel de estudios	Básico	60/354 (17 %)	294/354 (83 %)	1,7E-02 0,61 (0,40-0,92)	3,6E-01 0,79 (0,47-1,31)
	Medio/Alto	57/227 (25 %)	170/227 (75 %)		
Tabaco	Fumador/ Exfumador	64/264 (24 %)	200/264 (80 %)	1,5E-02 1,65 (1,10-2,48)	1,7E-01 1,46 (0,85-2,49)
	No Fumador	54/333 (16 %)	279/333 (79 %)		
Consumo de Alcohol	Si	88/450 (20 %)	362/450 (80 %)	6,2E-01 1,12 (0,72-1,75)	6,7E-01 0,89 (0,52-1,53)
	No	34/159 (21 %)	125/159 (79 %)		
FR	Positivo	100/489 (20,4%)	389/489 (79 %)	7,3E-01 0,92 (0,57-1,49)	8,0E-01 0,92 (0,51-1,68)
	Negativo	26/136 (19 %)	110/136 (81 %)		
Anti-CCP	Positivo	87/431 (20 %)	344/431 (80 %)	9,3E-01 1,02 (0,65-1,60)	6,5E-01 0,88 (0,50-1,54)
	Negativo	33/161 (20 %)	128/161 (80 %)		
Edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$		52,28 $\pm$ 12,6	53,08 $\pm$ 11,8	5,1E-01 1,01 (0,99-1,02)	1,0E+00 1,00 (0,98-1,02)
Años de evolución de la enfermedad		9,35 $\pm$ 7,8	9,47 $\pm$ 7,9	8,8E-01 1,00 (0,98-1,03)	4,4E-01 0,99 (0,96-1,02)
N° de FAMES previos		2,05 $\pm$ 1,4	2,58 $\pm$ 1,7	1,3E-03 1,23 (1,08-1,40)	8,6E-02 1,15 (0,98-1,36)
N° de comorbilidades previas		0,47 $\pm$ 0,9	0,63 $\pm$ 0,9	9,3E-02 1,23 (0,97-1,56)	5,5E-01 1,09 (0,82-1,45)
DAS28 (SB)		4,83 $\pm$ 1	5,72 $\pm$ 1,1	3,0E-13 2,16 (1,76-2,66)	1,1E-10 2,22 (1,74-2,83)

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología. **SB:** semana basal, **S12:** semana 12, **FAMES:** fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE. Los valores de P son resultados del análisis realizado con el test de regresión logística univariante y multivariante. **OR =** odds ratio estimado a la no respuesta



En relación a las variables epidemiológicas se observó que el nivel de estudios medio-alto se asociaba a la remisión en el análisis univariante ( $P=1,7\cdot 10^{-2}$ , OR (IC95%)=0,61 (0,40-0,92)) pero al realizar el análisis multivariante esta asociación desapareció. En relación al género se observó que el género masculino estaba asociado de forma significativa a la remisión pero solo en el análisis univariante ( $P=4,6\cdot 10^{-2}$ , OR (IC95%)=0,61 (0,38-0,99)). El hábito tabáquico se asoció a la remisión en el análisis univariante ( $P=1,5\cdot 10^{-2}$ , OR (IC95%)=1,65 (1,10-2,48)) pero al igual como se observó al analizar la respuesta clínica esta asociación desaparece en el análisis multivariante.

Entre las variables clínicas, se objetivó que el número de FAMES previos estaba asociado de forma inversa con la remisión en el análisis univariante ( $P=1,3\cdot 10^{-3}$ , OR (IC95%)= 1,23 (1,08-1,40)) pero no en el multivariante. Tal y como se observa en la tabla 29 el valor del índice DAS28 a la SB se asoció de forma inversa con la remisión clínica tanto en el análisis univariante ( $P=3,0\cdot 10^{-13}$ , OR (IC95%)=2,16 (1,76-2,66)) como en el multivariante ( $P=1,1\cdot 10^{-10}$ , OR (IC95%)=2,22 (1,74-2,83)).

### 3.2.2.- Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la remisión en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Las características epidemiológicas, clínicas y serológicas según el tratamiento anti-TNF $\alpha$  y la asociación de éstas con la remisión clínica se observan en la tabla 30.

En el análisis univariante y multivariante, el género no se asoció de forma significativa con la remisión clínica en ninguno de los tres grupos de tratamiento. En relación al hábito tabáquico, en el grupo de pacientes tratados con ETA, se observó una asociación directa entre el tabaco y la remisión ( $P=8,1\cdot 10^{-3}$ , OR (IC95%)=2,21 (1,23-3,96)), pero tal y como se ha descrito en los análisis previos esta asociación también estaba sesgada por otras variables. El consumo de alcohol no estaba asociado a la remisión clínica en los grupos de pacientes tratados con los diferentes anti-TNF $\alpha$ .

El nivel de estudios medio-alto se asoció a la remisión clínica en el grupo de pacientes tratados con ADA en el análisis multivariante ( $P=2,6\cdot 10^{-2}$ , OR (IC95%) 0,31(0,11-0,87)).

En relación a las variables serológicas no se observó ninguna asociación significativa entre la presencia de anticuerpos FR y anti-CCP y la remisión en ninguno de los grupos de tratamiento estudiado, tal y como se observa en la tabla 30.

En el grupo de pacientes tratados con ETA se observó una asociación inversa entre el número de comorbilidades previas y la remisión clínica, pero solo se observó esta asociación en el análisis univariante ( $P=3,3\cdot 10^{-2}$ , OR (IC95%) 1,22 (1,02-1,46)).

Los resultados relativos a los años de evolución y a la edad de los pacientes al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  se observan en la tabla 30.

**Tabla 30.** Asociación de las variables epidemiológicas, clínicas y serológicas con la remisión en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$ 

VARIABLE*	INFLIXIMAB		ETANERCEPT		ADALIMUMAB	
	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)	Análisis Univariante P OR (95% CI)	Análisis Multivariante P OR (95% CI)
<b>Género</b>	1,3E-01 0,46 (0,16-1,26)	4,3E-01 0,53 (0,11-2,59)	3,2E-01 0,70 (0,35-1,40)	5,2E-01 1,39 (0,51-3,84)	3,9E-01 0,67 (0,27-1,68)	4,9E-01 0,63 (0,17-2,33)
<b>Nivel de estudios</b>	5,9E-01 0,78 (0,31-1,93)	9,6E-01 1,03 (0,31-3,40)	5,6E-02 0,57 (0,32-1,01)	9,8E-01 1,01 (0,46-2,24)	6,2E-02 0,47 (0,21-1,04)	2,6E-02 0,31 (0,11-0,87)
<b>Tabaco</b>	9,8E-01 1,01 (0,41-2,52)	7,6E-01 0,82 (0,24-2,82)	8,1E-03 2,21 (1,23-3,96)	7,0E-02 2,22 (0,94-5,25)	3,8E-01 1,41 (0,66-3,04)	5,6E-01 1,37 (0,47-3,99)
<b>Consumo de Alcohol</b>	1,4E-01 0,38 (0,11-1,35)	4,3E-02 0,19 (0,04-0,95)	2,6E-02* 2,05 (1,09-3,84)	2,8E-01 1,55 (0,70-3,45)	7,2E-01 0,86 (0,36-2,01)	9,6E-01 0,97 (0,33-2,89)
<b>FR</b>	9,6E-01 1,02 (0,38-2,74)	5,4E-01 1,48 (0,42-5,14)	9,6E-01 0,98 (0,48-1,99)	8,8E-01 0,93 (0,36-2,43)	9,6E-01 0,98 (0,38-2,49)	5,3E-01 0,68 (0,20-2,29)
<b>Anti-CCP</b>	6,4E-02 0,25 (0,06-1,09)	1,2E-01 0,27 (0,05-1,40)	8,8E-01 1,05 (0,56-1,95)	6,7E-01 0,83 (0,36-1,91)	1,0E-01 2,05 (0,87-4,83)	1,0E-01 2,58 (0,83-8,06)
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>	8,9E-01 1,00 (0,96-1,04)	5,2E-01 1,02 (0,97-1,07)	1,8E-01 1,02 (0,99-1,04)	5,8E-01 1,01 (0,98-1,04)	6,6E-01 0,99 (0,96-1,03)	6,3E-02 0,95 (0,90-1,00)
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>	5,9E-01 1,02 (0,95-1,09)	5,5E-01 1,03 (0,94-1,12)	3,6E-01 1,02 (0,98-1,05)	4,5E-01 0,98 (0,93-1,03)	2,9E-01 0,98 (0,94-1,02)	4,0E-01 0,98 (0,92-1,03)
<b>Nº de FAMES previos</b>	6,7E-01 0,91 (0,58-1,41)	6,2E-02 0,56 (0,30-1,03)	1,7E-01 1,28 (0,90-1,82)	4,3E-01 1,19 (0,77-1,83)	1,1E-01 1,51 (0,90-2,52)	3,6E-02 2,19 (1,05-4,57)
<b>Nº de comorbilidades previas</b>	2,7E-01 1,16 (0,89-1,51)	1,6E-01 1,29 (0,91-1,85)	3,3E-02 1,22 (1,02-1,46)	4,0E-01 1,11 (0,87-1,42)	2,0E-01 1,19 (0,91-1,56)	6,9E-01 1,08 (0,75-1,54)
<b>DAS28 (SB)</b>	1,6E-03 1,97 (1,29-3,01)	2,8E-03 2,67 (1,40-5,09)	5,9E-08 2,26 (1,69-3,04)	1,0E-06 2,45 (1,71-3,51)	1,3E-03 2,04 (1,32-3,16)	2,6E-03 2,37 (1,35-4,15)

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 102, 103, 104 del apartado de metodología, **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Los valores de P son resultados del análisis realizado con el test de regresión logística univariante y multivariante. **OR** = odds ratio estimado a la no respuesta.

En el análisis univariante y multivariante se observó que el índice DAS28 (SB) presenta una asociación inversamente proporcional con la remisión en los pacientes tratados con IFX, ETA y ADA. La asociación más robusta con esta variable se observó en el grupo de pacientes tratados con ETA tanto en el análisis univariante ( $P=5,9E-08$ , OR (IC95%= 2,26 (1,69-3,04)) como en el multivariante ( $P=1,0E-06$ , OR (IC95%=2,45 (1,71-3,51))).

#### 4.- Análisis de los biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$

Tal y como se describe en la metodología, de los 628 pacientes con AR que habían recibido una terapia anti-TNF $\alpha$  de primera línea y que hayan sido incluidos en el análisis de los biomarcadores no genéticos, 376 fueron genotipados y por tanto incluidos en el estudio de asociación de genoma completo. Tras el control de calidad previamente descrito un número total de 361 pacientes fueron incluidos en el análisis para la identificación de biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

**Tabla 31.** Características epidemiológicas, clínicas y serológicas de la cohorte estudiada

Variables*		n (%)
<b>Género</b>	Masculino	64/361 (18 %)
	Femenino	197/361 (82 %)
<b>Nivel de estudios</b>	Básico	212/343 (62 %)
	Medio/Alto	131/343 (38 %)
<b>Tabaco</b>	Fumador activo	91/358 (25 %)
	Exfumador	63/358 (18 %)
	No Fumador	204/358 (57 %)
<b>Consumo de Alcohol</b>	Si	266/361 (74 %)
	No	95/361 (26 %)
<b>Tratamiento</b>	Infliximab	132/361 (36 %)
	Etanercept	133/361 (37 %)
	Adalimumab	96/361 (27 %)
<b>Autoanticuerpos</b>	FR positivo	282/360 (78 %)
	Anti-CCP positivo	271/348 (78%)
<b>N° de FAMES previos <math>\geq 2</math></b>		266/360 (74 %)
<b>N° de comorbilidades previas <math>\geq 2</math></b>		57/361 (16 %)
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>		10,24 $\pm$ 8,3
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		53,35 $\pm$ 11,8
<b>DAS28 (SB)</b>		5,57 $\pm$ 1,1
<b>DAS28 (S12)</b>		3,96 $\pm$ 1,4
<b><math>\Delta</math>DAS28</b>		1,60 $\pm$ 1,3

\*Variables del cuestionario clínico y epidemiológico definidas en las páginas 97, 98, 99 del apartado de metodología **SB**: semana basal, **S12**: semana 12, **FAMES**: fármacos modificadores de la enfermedad. Para las variables dicotómicas se calculó las frecuencias y para las continuas las medias y la DE.

En relación a las características epidemiológicas, 197 pacientes (82,3%) eran de género femenino, con una media de los valores de la edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  y de los años de evolución de la enfermedad de  $53,35 \pm 11,8$  años y  $10,24 \pm 8,3$  años, respectivamente.

Los resultados relativos al nivel de estudios, al hábito tabáquico y al consumo de alcohol se observan en el tabla 31.

En relación al tratamiento anti-TNF $\alpha$ , 133 pacientes fueron tratados con ETA, 132 con IFX y 96 con ADA. El valor de la media del DAS28 (SB) fue de  $5,57 \pm 1,12$ . El resto de resultados relativos a las variables clínicas y serológicas se observan en la tabla 11.

Utilizando los criterios que se han descrito previamente, se observó que de 361 pacientes, 269 (75%) cumplían el criterio EULAR de respondedor (i.e. bueno y moderado) y 92 pacientes (25%) cumplían el criterio de no respondedor a la semana 12 del inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

#### 4.1.- Estudio de asociación de genoma completo

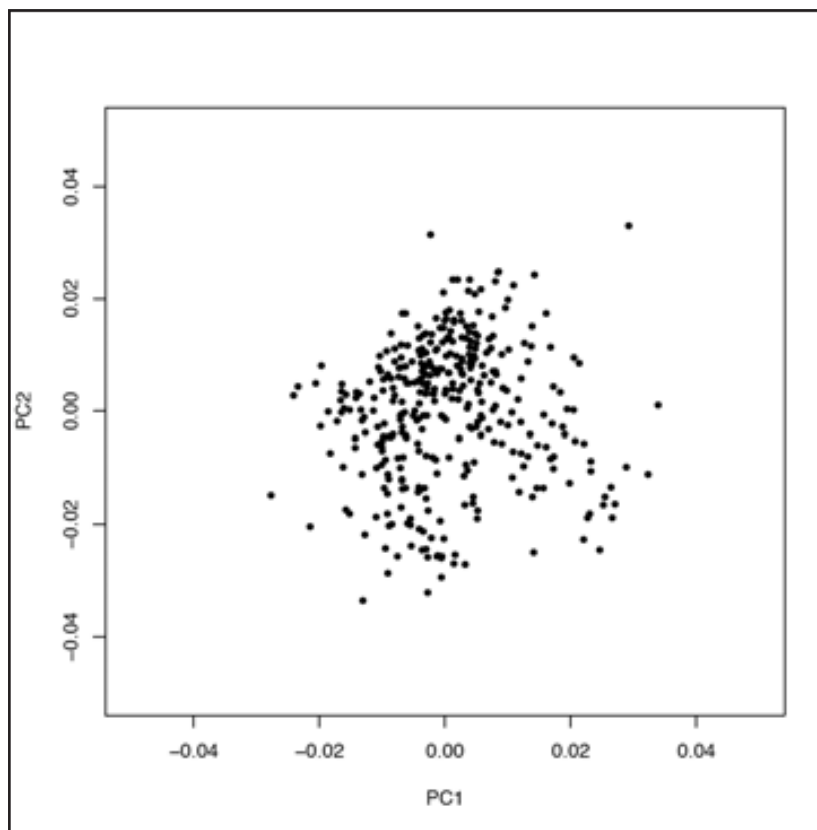
##### 4.1.1.- Control de calidad

Del total de 376 muestras en las que se había realizado un genotipado completo y se disponía de la totalidad de los datos sobre la actividad de la enfermedad, se excluyeron un total de 15 muestras:

- 12 muestras por presentar un *background* genético diferenciado del resto de la muestra en base a los 10 primeros componentes principales de variación (calculados por PCA mediante el programa *Eigenstrat*).
- 3 muestras por presentar un porcentaje de genotipado inferior al 95%

Como se puede observar en el gráfico 8, la distancia genética entre los pacientes con AR fue mínima, sugiriendo un impacto insignificante en la estratificación poblacional. Por ejemplo en el primer componente principal ningún individuo estaba a más de 4 desviaciones de la media (i.e. generalmente se descartan individuos a  $> 10$  DE) indicando que el control de calidad fue óptimo. Como la presencia de estratificación poblacional es muy baja (factor de inflación genómica=1.06) en la cohorte de pacientes, no se utilizaron los componentes principales para ajustar el estadístico de asociación.

**Gráfico 8.** Primer y segundo componentes principales de variación en la muestra de pacientes con AR analizados en el presente estudio



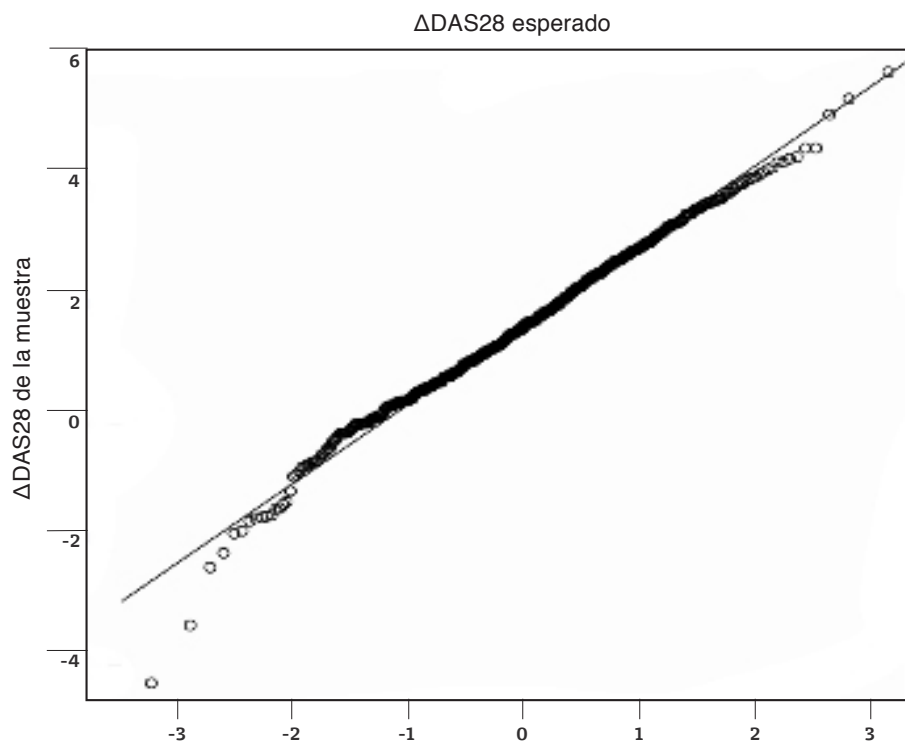
En relación al control de calidad del total de 620.901 SNPs disponibles en el chip se descartaron 21.890 sondas específicas para CNVs, 15.668 SNPs del cromosoma X y 138 SNPs mitocondriales resultando un subtotal de 583.205 SNPs. De este subtotal se descartaron los SNPs con un genotipado <95% (1,7%) y los SNPs con MAF <5% (10,55%). En total, 511.754 SNPs fueron utilizados en el estudio de asociación genoma completo en relación con la respuesta a anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

#### 4.1.2.- GWAs en relación con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Se evaluó la distribución del  $\Delta$ DAS28 y se comprobó que seguía una distribución normal. La utilización de un método paramétrico como la regresión lineal para el análisis cuantitativo se basa en la asunción de normalidad de la variable de respuesta. Por este motivo, en la gráfica 5 se puede ver la representación *Q-Q plot* donde se representa la distribución de los valores del  $\Delta$ DAS28 (eje ordenadas) contra los valores esperados en una distribución normal (eje abscisas). En variables normalmente distribuidas se espera que la mayoría de puntos se mantengan sobre la línea diagonal. Excluyendo los individuos con respuesta negativa extrema ( $\Delta$ DAS28 <-2, 4 individuos), el test de normalidad de

*Shapiro-Wilk* corroboró esta normalidad de la variable de respuesta ( $P=0,3$ ) tal y como se observa en el Gráfico 9.

**Gráfico 9.** Representación Q-Q plot.



La primera estrategia utilizada fue el análisis de asociación cuantitativa entre los SNPs genotipados y el  $\Delta$ DAS28. Puesto que el DAS28 de la semana basal estaba asociado de forma muy significativa ( $P= 5,35E-19$ ) con el  $\Delta$ DAS28 en nuestra cohorte, se optó por ajustar la asociación por esta covariable. Ninguna de las restantes variables clínicas y epidemiológicas evaluadas mostró una fuerte asociación con el  $\Delta$ DAS28, y por tanto, no se incluyeron como covariables en el análisis de regresión lineal.

En este análisis no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa a escala genómica ( $P=<5E-8$ ) entre los SNPs genotipados y el  $\Delta$ DAS28. No obstante se obtuvieron un total de 212 SNPs situados en 157 *loci* distintos que presentaron asociación con valores de  $P$  entre  $5E-04$  y  $5E-07$  con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . En la tabla 32 se observan los primeros 20 SNPs en relación a la significancia estadística. De estos 20 SNPs, 8 SNPs se sitúan en un intrón de 8 *loci* distintos (*GLT25D2*, *SEMA5A*, *C8orf86*, *A1Cf*, *NPAS3*, *LOC729911*, *MGST1*, *PAK7*) y 12 SNPs se sitúan en regiones intergénicas, 6 SNPs a menos de 50 kb de un gen (*MRPS22*, *COL5A1*, *MGMT*, *OR8A1*, *EIF4B*, *ITGA3*) y 6 SNPs a más de 200 kb del gen más próximo (*FLJ30375*, *HTR1A*, *IGFBP3*, *HNF4G*, *TYRP1*, *WDR72*).

**Tabla 32.** Loci más significativamente asociados al  $\Delta$ DAS28 en el estudio de GWAS. N=20

SNP	CHR	PB	GEN	LOCALIZACION	ALELO MENOR	MAF	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	OR (IC95%)
rs1926868	1	183955574	GLT25D2	INTRON	A	0,17	-0,63	7,84E-05	3,10 (1,83-5,22)
rs4894405	3	139021139	MRPS22	FLANQUEANTE 5' (41,7kb)	T	0,42	-0,43	1,18E-05	2,11 (1,48-2,99)
rs7651055	3	147345411	FLJ30375	FLANQUEANTE 5' (207,8kb)	A	0,40	-0,40	4,55E-05	1,55 (1,09-2,19)
rs17309469	5	9100211	SEMA5A	INTRON	A	0,13	-0,68	6,12E-05	2,37 (1,36-4,14)
rs7716031	5	62725286	HTRIA	FLANQUEANTE 3' (530,5kb)	A	0,46	-0,37	6,71E-05	1,86 (1,32-2,62)
rs6976880	7	46241570	IGFBP3	FLANQUEANTE 5' (289,7kb)	A	0,071	0,53	8,30E-05	0,42 (0,23-0,78)
rs2461327	8	38373924	C8orf86	INTRON	G	0,14	-0,69	4,28E-05	2,44 (1,42-4,19)
rs2977327	8	76705405	HNF4G	FLANQUEANTE 3' (253,2kb)	T	0,18	0,41	5,44E-05	0,57 (0,37-0,87)
rs10115296	9	137496292	COL5A1	FLANQUEANTE 5' (37,4kb)	C	0,43	-0,44	9,05E-06	1,22 (0,87-1,71)
rs1339284	9	12237417	TYRP1	FLANQUEANTE 5' (455,9kb)	A	0,20	-0,58	6,49E-06	1,53 (0,99-2,36)
rs7100805	10	131254534	MGMT	FLANQUEANTE 5' (10,9kb)	G	0,022	0,69	6,87E-05	0,23 (0,08-0,63)
rs6479768	10	52638933	AICF	INTRON	T	0,21	-0,51	6,92E-05	1,58 (1,03-2,43)
rs10893276	11	124452329	OR8A1	FLANQUEANTE 3' (11,4kb)	T	0,40	0,41	6,70E-06	0,66 (0,47-0,93)
rs2075237	12	16510079	MGST1	INTRON	G	0,16	0,44	6,05E-05	0,53 (0,34-0,82)
rs949734	12	53373962	EIF4B	FLANQUEANTE 5' (26,1kb)	C	0,23	-0,52	9,79E-05	2,59 (1,67-4,04)
rs952363	14	33550386	NPAS3	INTRON	T	0,21	0,41	5,93E-05	0,57 (0,38-0,85)
rs12906934	15	79542881	LOC729911	INTRON	C	0,22	0,38	8,89E-05	0,48 (0,32-0,70)
rs17545046	15	53402010	WDR72	FLANQUEANTE 3' (403,9kb)	A	0,24	-0,54	1,03E-05	2,09 (1,38-3,18)
rs199146	17	48122961	ITGA3	FLANQUEANTE 5' (10,4kb)	T	0,25	-0,49	8,91E-05	1,78 (1,19-2,67)
rs10485735	20	9773877	PAK7	INTRON	A	0,19	-0,53	1,56E-05	1,36 (0,88-2,12)

CHR: cromosoma, PB: par de bases, MAF: frecuencia del alelo menor,  $\beta$ : beta, OR: odds ratio estimado a la no respuesta



**Tabla 33.** Loci asociados ( $P < 5 \times 10^{-4}$ ) al  $\Delta$ DAS28 y seleccionados por su asociación funcional con la Artritis Reumatoide. (SNP=11)

SNPS DE MUESTRA										
SNP	CHR	PB	GEN	LOCALIZACION	ALELO MENOR	MAF	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	OR (IC95%)	
rs12679609	8	10211062	MSRA	INTRON	A	0,13	-0,52	2,9E-04	1,57 (0,93-2,64)	
rs758831	17	5705244	NLRPI	FLANQUEANTE 5' (217,41kb)	A	0,2554	-0,4389	0,0002621	2,08 (1,38-3,14)	
rs10940495	5	55262660	IL6ST	INTRON	G	0,22	0,39	3,31E-04	0,74 (0,50-1,10)	
rs888186	2	217567718	IGFBP5	FLANQUEANTE 5' (7,4kb)	G	0,038	0,56	4,06E-04	0,33 (0,15-0,74)	
rs897685	11	113864109	HTR3A	FLANQUEANTE 3' (3,1kb)	C	0,11	0,48	3,13E-04	0,81 (0,48-1,35)	
rs350897	19	4112895	MAP2K2	INTRON	T	0,35	0,33	3,85E-04	0,65 (0,46-0,92)	
rs4077460	5	68572668	CDK7	INTRON	C	0,37	0,33	3,03E-04	0,67 (0,48-0,95)	
rs7097340	10	96864595	CYP2C8	FLANQUEANTE 5' (35,3kb)	A	0,098	0,52	1,9E-04	0,70 (0,41-1,21)	
rs2910739	5	37894278	GDMF	FLANQUEANTE 5' (54,5kb)	T	0,23	0,38	3,85E-04	0,69 (0,46-1,01)	
rs333958	1	110436506	CSF1	FLANQUEANTE 5' (16,7kb)	T	0,38	-0,38	1,46E-04	1,80 (1,26-2,56)	
rs7333963	13	47792381	HTR2A	FLANQUEANTE 5' (386 kb)	T	0,18	-0,54	1,94E-04	1,71 (1,08-2,71)	

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** beta, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

**Tabla 34.** Loci asociados ( $P < 5 \times 10^{-4}$ ) al  $\Delta$ DAS28 o a la respuesta EULAR seleccionados por originar un cambio de aminoácido. (SNP=4)

SNPS DE MUESTRA										
SNP	CHR	PB	GEN	CAMBIO DE AA	ALELO MENOR	MAF	$\beta$	P	OR (IC95%)	
rs10471774	5	68616331	CCDC125	V [Val] : M [Met]	A	0,3913	0,3453	1,68E-04 (ADAS28)	0,65 (0,46-0,91)	
rs7824	14	105954687	CRIP1	C [Cys] : S [Ser]	A	0,2759	-0,4084	2,29E-04 (ADAS28)	1,67 (1,11-2,48)	
rs32857	5	79891128	ANKRD34B	L [Leu] : S [Ser]	A	0,25	-	9,68E-06 (EULAR)	2,56 (1,67-3,92)	
rs205498	17	52333793	TRIM25	P [Pro] : L [Leu]	G	0,337	-	5,31E-06 (EULAR)	2,37 (1,62-3,46)	

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** beta, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta, **AA:** aminoácido, **V [Val]:** valina, **M [Met]:** metionina, **C [Cys]:** cisteína, **S [Ser]:** serina, **L [Leu]:** leucina, **P [Pro]:** prolina.

Posteriormente tal y como se observa en la tabla 33 de los 192 SNPs restantes se seleccionaron 11 SNPs por su posible asociación funcional con la AR. De estos SNPs, 4 están situados en un intrón (*MSRA*, *IL6ST*, *MAP2K2*, *CDK7*) y 7 en regiones intergénicas (*NLRP13*, *IGFBP5*, *HTR3A*, *HTR2A*, *CYP2B8*, *GDNF*, *CSF1*).

Se seleccionaron dos SNPs (rs10471774 y el rs7824) no sinónimos situados en exones de los *loci* *CCDC125* (V [Val]: M [Met]) y *CRIP1* (C [Cys]: S [Ser]), que presentaron asociación con el  $\Delta$ DAS28 tal y como se observa en la tabla 34. Estos SNPs también fueron seleccionados del total de SNPs por su importancia funcional.

La segunda estrategia utilizada fue el análisis genómico en relación a la respuesta clínica basada en los criterios de respuesta EULAR. En este análisis tampoco se observó ninguna asociación estadísticamente significativa a escala genómica ( $P < 5E-08$ ) entre los SNPs y la respuesta clínica. No obstante se obtuvieron un total de 253 SNPs situados en 166 *loci* independientes con valores de  $P$  entre  $5E-04$  y  $5E-08$ .

En la tabla 35 se observan los primeros 20 SNPs en relación a la significancia estadística. De estos 20 SNPs, 9 SNPs se sitúan en un intrón de 9 *loci* distintos (*GLT25D2*, *KIF26B*, *RNF19B*, *ARMC2*, *PARCG*, *LHFPL3*, *SOX5*, *SERPINE3*, *TRIM25*) y 11 SNPs se sitúan en regiones intergénicas, 4 a menos de 50 kb (*ZNF613*, *EIF4B*, *ANKRD34B*, *MRPS22*), 4 entre 50 y 200 Kb (*LRRN1*, *TUSC1*, *PYROXD2*, *KCTD1*) y 3 a más de 200 Kb (*EPHA3*, *SLC39A10*, *DTWD2*).

Al igual que con la primera estrategia, se seleccionaron 17 SNPs de los 233 SNPs restantes por su posible relación funcional con la AR. De estos SNPs, 7 se sitúan en un intrón de un gen (*SLC22A5*, *PTK2B*, *ADAM12*, *ETS1*, *CD44*, *DCC*, *SLC24A3*), 10 en regiones intergénicas, 6 a menos de 50 Kb (*NLRP3*, *TSLP*, *PIK3CG*, *DLG5*, *MMP1*, *MMP3*) y 4 SNPs situados entre 50 y 200 Kb (*CSF3R*, *TANK*, *EMCN*, *CYP7B1*).

Dos SNPs fueron seleccionados de este análisis tal y como se observan en la tabla 34 por ser SNPs no sinónimos situados uno de ellos en el gen *ANKRD34B* (L [Leu]: S [Ser]) y otro en el gen *TRIM25* (P [Pro]: L [Leu]).

Posteriormente, tal y como se observa en la tabla 37, se seleccionaron aquellos SNPs con una asociación significativa observada en las dos estrategias (i.e.  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR) utilizadas para el análisis de asociación. Se observó que 18 SNPs tenían un valor de  $P < 5E-04$ . De estos, 8 SNPs estaban situados en un intrón (*RNF19B*, *GLT25D2*, *ROBO2*, *GALNT17*, *DDX60L*, *FGD3*, *NLRP13*, *LINC00478*) y 10 en regiones intergénicas, 4 a menos de 50 Kb (*MRPS22*, *EIF4B*, *ANKRD34C*, *ZNF350*), 3 entre 50 y 200 Kb (*GRM7*, *F11*, *LHX2*) y 3 a más de 200 Kb (*HTR1A*, *ONECUT1*, *NLRP1*).

**Tabla 35.** Loci más significativamente asociados a la respuesta EULAR en el estudio de GWAS. (SNP=20)

SNP	CHR	BP	GEN	LOCALIZACION	ALELO MENOR	MAF	P R. EULAR	OR (IC95%)
rs1887283	1	183976909	GLT25D2	INTRON	A	0,1685	6,11E-06	3,20 (1,89-5,42)
rs6677662	1	245490691	KIF26B	INTRON	A	0,3478	5,28E-05	2,12 (1,47-3,07)
rs194652	1	33419206	RNF19B	INTRON	A	0,3967	5,35E-05	2,06 (1,48-2,94)
rs1367424	2	195922433	SLC39A10	FLANQUEANTE 5' (599,1 kb)	G	0,1141	2,93E-05	3,72 (1,94-7,16)
rs6798310	3	90224813	EPHA3	FLANQUEANTE 3' (693,5 kb)	G	0,1359	2,15E-05	3,367 (1,87-6,06)
rs4894405	3	139021139	MRPS22	FLANQUEANTE 5' (41,7 kb)	A	0,4239	2,36E-05	2,11 (1,49-3)
rs17293711	3	3690221	LRRN1	FLANQUEANTE 5' (150,9 kb)	G	0,2337	4,31E-05	2,43 (1,57-3,75)
rs383833	5	79883548	ANKRD34B	FLANQUEANTE 5' (17,2 kb)	A	0,2609	6,38E-06	2,57 (1,69-3,91)
rs4920888	5	117678736	DTWD2	FLANQUEANTE 3' (493,8 kb)	G	0,4891	1,93E-05	2,09 (1,49-2,94)
rs911475	6	109263187	ARMC2	INTRON	A	0,2663	2,39E-05	2,39 (1,58-3,60)
rs04844	6	163551376	PACRG	INTRON	G	0,08696	5,55E-05	0,33 (0,19-0,58)
rs2385168	7	104078657	LHFPL3	INTRON	A	0,1304	3,99E-06	0,34 (0,22-0,55)
rs10738725	9	25603439	TUSCI	FLANQUEANTE 3' (72,9 kb)	A	0,3152	1,42E-06	2,56 (1,73-3,78)
rs6584185	10	100087228	PYROXD2	FLANQUEANTE 3' (56,1 kb)	A	0,2609	3,46E-05	2,36 (1,56-3,57)
rs949734	12	53373962	EIF4B	FLANQUEANTE 5' (26,1 kb)	G	0,2283	1,51E-05	2,60 (1,67-4,04)
rs526058	12	24435421	SOX5	INTRON	A	0,3681	3,87E-05	2,13 (1,48-3,07)
rs9535647	13	51916167	SERPINE3	INTRON	A	0,5761	4,74E-05	2,01 (1,43-2,82)
rs2525994	17	54976922	TRIM25	INTRON	C	0,337	5,31E-06	2,37 (1,62-3,46)
rs1667550	18	24332476	KCTD1	FLANQUEANTE 5' (95,1 kb)	A	0,2011	1,33E-06	0,38 (0,25-0,57)
rs7255377	19	52451338	ZNF613	FLANQUEANTE 3' (2,3 kb)	G	0,212	1,11E-05	2,73 (1,72-4,34)

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

**Tabla 36.** Loci asociados ( $P < 5 \times 10^{-4}$ ) a la respuesta EULAR y seleccionados por su asociación funcional con la Artritis Reumatoide. (SNP=17)

SNP	CHR	BP	GEN	LOCALIZACION	ALELO MENOR	MAF	P R. EULAR	OR (IC95%)
rs10925006	1	24752084	NLRP3	FLANQUEANTE 5' (27,4 Kb)	G	0,37	3,14E-04	1,92 (1,34-2,75)
rs7540413	1	37040374	CSF3R	FLANQUEANTE 5' (91,5 Kb)	G	0,37	4,74E-04	1,88 (1,32-2,69)
rs10164859	2	161891736	TANK	FLANQUEANTE 5' (101,7 Kb)	A	0,11	8,43E-05	3,51 (1,81-6,79)
rs7680366	4	101572039	EMCN	FLANQUEANTE 5' (132,8 Kb)	G	0,49	9,73E-05	1,97 (1,40-2,77)
rs274550	5	131728712	SLC22A5	INTRON	C	0,24	3,30E-04	2,13 (1,40-3,24)
rs17132762	5	110417875	TSLP	FLANQUEANTE 3' (4,2 Kb)	A	0,011	4,52E-04	0,12 (0,028-0,49)
rs4727661	7	106482573	PIK3CG	FLANQUEANTE 5' (23,4 Kb)	C	0,38	2,04E-04	1,95 (1,37-2,79)
rs4273884	8	65786716	CYP7B1	FLANQUEANTE 5' (75,4 Kb)	A	0,29	3,75E-04	0,52 (0,36-0,75)
rs11783759	8	27245790	PTK2B	INTRON	A	0,54	3,97E-04	1,83 (1,31-2,57)
rs11002285	10	79526393	DLG5	FLANQUEANTE 3' (24,2 Kb)	G	0,10	3,67E-04	3,14 (1,63-6,08)
rs1710313	10	127734513	ADAMI2	INTRON	C	0,43	4,40E-04	1,85 (1,31-2,61)
rs7926975	11	128335657	ETS1	INTRON	A	0,18	4,61E-04	2,33 (1,44-3,77)
rs1144396	11	102679052	MMP1	FLANQUEANTE 5' (10,1 Kb)	A	0,61	2,33E-04	1,89 (1,34-2,66)
rs1010698	11	102701021	MMP3	FLANQUEANTE 3' (5,5 Kb)	C	0,38	3,30E-04	0,54 (0,38-0,75)
rs4756196	11	35198108	CD44	INTRON	A	0,37	4,74E-04	0,54 (0,39-0,77)
rs1145242	18	49955459	DCC	INTRON	G	0,35	2,78E-04	1,96 (1,36-2,82)
rs6046010	20	19333402	SLC24A3	INTRON	C	0,58	2,93E-04	1,86 (1,33-2,61)

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** beta, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

**Tabla 37.** Loci comunmente asociados ( $P < 5e-4$ ) en los GWAS de asociación con el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR. (SNP=18)

SNP	CHR	PB	GEN	LOCALIZACION	ALELO MENOR	MAF	$\beta$	$P_{\Delta$ DAS28}	$P_{R\_EULAR}$	OR (IC95%)
rs194652	1	33419206	RNF19B	INTRON	A	0,40	-0,36	2,57E-04	5,35E-05	2,06 (1,45-2,94)
rs1887283	1	183976909	GLT25D2	INTRON	A	0,17	-0,64	8,11E-05	6,11E-06	3,20 (1,89-5,42)
rs4894405	3	139021139	MRPS22	FLANQUEANTE 5' (41,7 Kb)	A	0,42	-0,43	1,18E-05	2,36E-05	2,11 (1,49-3,00)
rs7612860	3	76489848	ROBO2	INTRON	G	0,54	-0,36	2,95E-04	1,39E-04	1,92 (1,37-2,70)
rs1488472	3	7840349	GRM7	FLANQUEANTE 3' (57,1 Kb)	A	0,043	0,50	3,50E-04	6,26E-05	0,24 (0,12-0,51)
rs737703	4	187286750	FII	FLANQUEANTE 3' (75,9 Kb)	G	0,043	0,55	1,75E-04	4,29E-04	0,28 (0,13-0,59)
rs6855872	4	172751522	GALNT17	INTRON	A	0,28	-0,43	1,96E-04	1,60E-04	2,14 (1,43-3,20)
rs1000775	4	169343522	DDX60L	INTRON	G	0,13	-0,67	1,39E-04	1,04E-04	2,98 (1,68-5,27)
rs7716031	5	62725286	HTR1A	FLANQUEANTE 3' (530,5 Kb)	A	0,46	-0,37	6,71E-05	3,49E-04	1,86 (1,32-2,62)
rs4838108	9	126848494	LHX2	FLANQUEANTE 5' (53,1 Kb)	A	0,16	-0,54	2,95E-04	1,01E-04	2,58 (1,58-4,22)
rs7850247	9	95747389	FGD3	INTRON	A	0,56	-0,33	4,60E-04	2,20E-04	1,88 (1,34-2,64)
rs949734	12	53373962	EIF4B	FLANQUEANTE 5' (26,1 Kb)	G	0,23	-0,52	9,79E-05	1,51E-05	2,60 (1,67-4,04)
rs12906934	15	79542881	ANKRD34C	FLANQUEANTE 3' (32,3 Kb)	C	0,22	0,38	8,89E-05	2,18E-04	0,48 (0,32-0,71)
rs17545046	15	53402010	ONECUT1	FLANQUEANTE 5' (319,8 Kb)	A	0,24	-0,54	1,03E-05	4,34E-04	2,09 (1,38-3,18)
rs758831	17	5705244	NLRP1	FLANQUEANTE 5' (217,4 Kb)	A	0,25	-0,44	2,62E-04	3,8E-04	2,08 (1,38-3,14)
rs8112515	19	52491250	ZNF350	FLANQUEANTE 5' (1,2 Kb)	G	0,27	-0,43	2,05E-04	3,88E-04	2,04 (1,37-3,05)
rs12982016	19	56421826	NLRP3	INTRON	A	0,58	-0,37	1,04E-04	9,20E-05	1,96 (1,40-2,76)
rs2823795	21	17808698	LINC00478	INTRON	A	0,52	-0,35	1,42E-04	7,25E-05	1,98 (1,41-2,78)

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** beta, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

### 4.1.3.- Estimación del poder estadístico de replicación

Para elaborar un listado final de SNPs candidatos, tal y como se ha explicado anteriormente en el apartado de la metodología, se procedió al cálculo del poder estadístico de los SNPs y *loci* pre-seleccionados. Se seleccionaron utilizando el criterio de la significancia estadística 18 SNPs que presentaron una asociación con un valor de  $P < 5E-04$  con el  $\Delta$ DAS28 y con la respuesta EULAR a la vez. Utilizando el criterio funcional se seleccionaron 11 SNPs identificados como asociados al  $\Delta$ DAS28 y 17 SNPs identificados como asociados a la respuesta EULAR.

Finalmente, se seleccionaron los 4 SNPs no sinónimos anteriormente comentados asociados ( $P < 5E-04$ ) al  $\Delta$ DAS28 o a la respuesta EULAR con el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

Se observó que 17 SNPs de los 50 SNPs seleccionados alcanzaron un poder de replicación de más del 80% en una muestra de 267 pacientes y 36 SNPs alcanzaron un poder de más del 80% en una muestra de 534 pacientes, tal y como se observa en la tabla 38.

**Tabla 38.** Poder de replicación de los 50 SNPs seleccionados según distintos criterios para el estudio de replicación

SNP	CHR	Genes	MAF	OR (IC 95%)	M1	M2
rs194652	1	<i>RNF19B</i>	0,40	2,06 (1,45-2,94)	82,2	98,3
rs1887283	1	<i>GLT25D2</i>	0,17	3,20 (1,89-5,42)	99,4	100
rs4894405	3	<i>MRPS22</i>	0,42	2,11 (1,49-3,00)	83,1	98,5
rs7612860	3	<i>ROBO2</i>	0,54	1,92 (1,37-2,70)	67,1	92,5
rs1488472	3	<i>GRM7</i>	0,043	0,24 (0,12-0,51)	16,9	29,2
rs737703	4	<i>F11</i>	0,043	0,28 (0,13-0,59)	16,1	27,6
rs6855872	4	<i>GALNT17</i>	0,28	2,14 (1,43-3,20)	87,9	99,3
rs1000775	4	<i>DDX60L</i>	0,13	2,98 (1,68-5,27)	98,4	99,9
rs7716031	5	<i>HTR1A</i>	0,46	1,86 (1,32-2,62)	69,7	93,8
rs4838108	9	<i>LHX2</i>	0,16	2,58 (1,58-4,22)	95,8	99,9
rs7850247	9	<i>FGD3</i>	0,56	1,88 (1,34-2,64)	63,4	90,3
rs949734	12	<i>EIF4B</i>	0,23	2,60 (1,67-4,04)	96,8	99,9
rs12906934	15	<i>ANKRD34C</i>	0,22	0,48 (0,32-0,71)	43,1	71,4
rs17545046	15	<i>ONECUT1</i>	0,24	2,09 (1,38-3,18)	85,9	99,0
rs758831	17	<i>NLRP1</i>	0,25	2,08 (1,38-3,14)	85,7	98,9
rs8112515	19	<i>ZNF350</i>	0,27	2,04 (1,37-3,05)	84,2	98,7
rs12982016	19	<i>NLRP13</i>	0,58	1,96 (1,40-2,76)	65,3	91,4
rs2823795	21	<i>C21orf34</i>	0,52	1,98 (1,41-2,78)	71,5	94,7
rs10925006	1	<i>NLRP3</i>	0,37	1,92 (1,34-2,75)	76,9	96,8
rs7540413	1	<i>CSF3R</i>	0,37	1,88 (1,32-2,69)	74,7	96,0
rs10164859	2	<i>TANK</i>	0,11	3,51 (1,81-6,79)	99,6	100
rs7680366	4	<i>EMCN</i>	0,49	1,97 (1,40-2,77)	73,0	95,3
rs274550	5	<i>SLC22A5</i>	0,24	2,13 (1,40-3,24)	87,5	99,3
rs17132762	5	<i>TSLP</i>	0,01	0,12 (0,028-0,49)	8,4	11,9
rs4727661	7	<i>PIK3CG</i>	0,38	1,95 (1,37-2,79)	78,0	97,2
rs4273884	8	<i>CYP7B1</i>	0,29	0,52 (0,36-0,75)	48,3	77,4
rs11783759	8	<i>PTK2B</i>	0,54	1,83 (1,31-2,57)	62,6	89,7
rs11002285	10	<i>DLG5</i>	0,10	3,14 (1,63-6,08)	98,5	99,9
rs1710313	10	<i>ADAM12</i>	0,43	1,85 (1,31-2,61)	70,5	94,2
rs7926975	11	<i>ETS1</i>	0,18	2,33 (1,44-3,77)	91,9	99,7
rs1144396	11	<i>MMP1</i>	0,61	1,89 (1,34-2,66)	59,2	87,3
rs1010698	11	<i>MMP3</i>	0,38	0,54 (0,38-0,75)	56,8	85,4
rs4756196	11	<i>CD44</i>	0,37	0,54 (0,39-0,77)	55,7	84,5
rs1145242	18	<i>DCC</i>	0,35	1,96 (1,36-2,82)	79,5	97,6
rs6046010	20	<i>SLC24A3</i>	0,58	1,86 (1,33-2,61)	60,9	88,6

SNP	CHR	Genes	MAF	OR (IC 95%)	M1	M2
rs12679609	8	MSRA	0,13	1,57 (0,93-2,64)	38,02	64,8
rs758831	17	NLRP1	0,2554	2,08 (1,38-3,14)	85,77	99
rs10940495	5	IL6ST	0,22	0,74 (0,50-1,10)	16,79	28,87
rs888186	2	IGFBP5	0,038	0,33 (0,15-0,74)	13,9	23,12
rs897685	11	HTR3A	0,11	0,81 (0,48-1,35)	8,48	12,05
rs350897	19	MAP2K2	0,35	0,65 (0,46-0,92)	35,49	61,22
rs4077460	5	CDK7	0,37	0,67 (0,48-0,95)	33,69	58,54
rs7097340	10	CYP2C8	0,098	0,70 (0,41-1,21)	11,92	19,09
rs2910739	5	GDNF	0,23	0,69 (0,46-1,01)	21,89	38,62
rs333958	1	CSF1	0,38	1,80 (1,26-2,56)	69,6	93,79
rs7333963	13	HTR2A	0,18	1,71 (1,08-2,71)	57,81	86,23
rs10471774	5	CCDC125	0,3913	0,65 (0,46-0,91)	38,33	65,23
rs7824	14	CRIP1	0,2759	1,67 (1,11-2,48)	59,84	87,79
rs32857	5	ANKRD34B	0,25	2,56 (1,67-3,92)	96,38	99,96
rs205498	17	TRIM25	0,337	2,37 (1,62-3,46)	92,66	99,79

**CHR:** cromosoma, **PB:** par de bases, **MAF:** frecuencia del alelo menor, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta, **M1:** muestra con 267 individuos, **M2:** muestra con 534 individuos.

1. SNPs asociados con el  $\Delta$ DAS28 y con la respuesta EULAR a la vez
2. SNPs asociados con la respuesta EULAR y relación funcional con la AR
3. SNPs asociados con el  $\Delta$ DAS28 y relación funcional con la AR
4. SNPs no sinónimos asociados con  $\Delta$ DAS28 o con la respuesta EULAR

#### 4.1.4.-Estudio de asociación de vías génicas

Esta estrategia utilizada para el análisis del estudio de asociación de genoma completo es otra alternativa a considerar en este tipo de estudios. Tal y como se ha comentado en el apartado de la metodología, este análisis se realizó por medio del programa GSEA comentado anteriormente en metodología. En este estudio se seleccionaron las vías génicas asociadas con un valor de  $P < 1E-03$  en el análisis de asociación en relación al  $\Delta$ DAS28 y a la respuesta clínica basada en la respuesta EULAR.

En el análisis obtenido en relación a la asociación con el  $\Delta$ DAS28 se identificaron 10 vías asociadas de forma significativa utilizando la base de datos *PathwayCommons* y 7 vías asociadas de forma significativa utilizando la base de datos *Reactome*, tal y como se observa en la tabla 39.

El número de genes involucrados en estas vías génicas es entre 11 y 127 genes. La asociación más significativa ( $P < 0,001$ ) se observó con dos vías, la primera identificada con la base de datos *PathwayCommons* (*Validated targets of C-MYC transcriptional activation*) y la segunda con la base de datos *Reactome* (*Basigin interactions*).



**Tabla 39.** Vías génicas asociadas con el  $\Delta$ DAS28

Vías de regulación génica	N° genes	P $\Delta$ DAS28	Base de datos
Validated targets of C-MYC transcriptional activation	67	<0.001	PathwayCommons
Basigin interactions	24	<0.001	Reactome
Integration of energy metabolism	37	0,001	PathwayCommons
Regulation of Insulin Secretion	26	0,001	PathwayCommons
C-MYC pathway	127	0,003	PathwayCommons
Reelin signaling pathway	28	0,003	PathwayCommons
Metabolism of vitamins and cofactors	36	0,003	PathwayCommons
Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors	36	0,003	PathwayCommons
Synthesis, Secretion, and Deacylation of Ghrelin	13	0,004	PathwayCommons
Netrin mediated repulsion signals	10	0,005	Reactome
Sulfur amino acid metabolism	23	0,005	Reactome
purine nucleotides degradation II (aerobic)	11	0,006	PathwayCommons
Synthesis, Secretion, and Deacylation of Ghrelin	14	0,006	Reactome
Platelet Adhesion to exposed collagen	12	0,007	Reactome
Platelet Adhesion to exposed collagen	13	0,008	PathwayCommons
Metabolism of vitamins and cofactors	49	0,009	Reactome
Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors	49	0,009	Reactome

En este estudio, también se han identificado asociaciones con vías metabólicas (i.e. vía de regulación de la insulina, metabolismo de vitaminas...etc) o con vías relacionadas con la adhesión plaquetaria y la respuesta determinada por el  $\Delta$ DAS28 a las 12 semanas de tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

**Tabla 40.** Vías génicas asociadas con la respuesta EULAR

Vías de regulación génica	N° genes	P EULAR	Base de datos
The NLRP3 inflammasome	12	<0,001	Reactome
Netrin mediated repulsion signals	10	0,003	Reactome
mTOR signalling	21	0,004	Reactome
PKB-mediated events	22	0,005	Reactome
The NLRP3 inflammasome	11	0,006	PathwayCommons
Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis	23	0,006	Reactome
Regulation of Rheb GTPase activity by AMPK	10	0,007	Reactome
Synthesis of bile acids and bile salts	17	0,008	Reactome
Downstream signaling of activated FGFR	29	0,009	PathwayCommons
Interleukin-2 signaling	17	0,009	PathwayCommons
Synthesis of bile acids and bile salts	16	0,009	PathwayCommons

En el análisis realizado con respecto a la respuesta EULAR se observó que 11 vías estaban asociadas con la respuesta clínica, 4 identificadas utilizando la base de datos *Pathway Commons* y 7 identificadas utilizando la base de datos *Reactome*.

El número de genes involucrados en estas vías génicas es entre 11 y 29 genes. La asociación más evidente ( $P < 0,001$ ) se observó con la vía del inflamosoma, tal y como se observa en la tabla 40.

Se han identificado asociaciones significativas entre vías asociadas a la inflamación (i.e. la vía del NLRP3 inflamosoma, la vía de señalización mTOR) y la respuesta EULAR de forma significativa.

## 5.- Estudio de replicación de *loci* previamente asociados a la respuesta anti-TNF $\alpha$

Para el estudio de replicación de los SNPs previamente publicados como asociados a la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR, se seleccionaron los 3 estudios de GWAS publicados previamente (Liu et al, Plant et al y Krintel et al) en relación a los poliformismos asociados con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  y los 2 estudios de genes candidatos (Cui et al y Potter et al). El primero de estos 2 estudios analiza la asociación con la respuesta de algunos SNPs previamente asociados con la susceptibilidad a desarrollar la AR y el segundo estudio analiza los SNPs situados en genes que participan en la vía de señalización del *NFkB* y en la función del *TLR*.

Se utilizó la corrección de Bonferroni para establecer el punto de corte del valor de *P* estadísticamente significativo. En todos los casos se utilizaron las mismas estrategias de análisis que los utilizados en nuestro estudio de GWAS (i.e.  $\Delta$ DAS28 y respuesta EULAR). En los casos en donde se observó una asociación estadísticamente significativa entre el SNP y la respuesta se analizaron dichas asociaciones utilizando el mismo modelo del estudio original si éste difería al utilizado en este proyecto.

### 5.1.- Estudio de replicación de loci candidatos del estudio publicado por Liu et al.

En el presente proyecto se han analizado aquellos SNPs que estaban asociados con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  identificados por Liu et al. En este estudio, 16 SNPs estuvieron asociados con el *re*/DAS28 y la respuesta clínica a las 14 semanas de seguimiento. En nuestro estudio sin embargo se ha utilizado las mismas estrategias utilizadas para el GWAS.

Para el estudio de replicación de estas 16 SNPs se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 3E-03$ .

Tal y como se observa en la tabla 41 ninguno de los SNPs identificados por Liu et al como SNPs candidatos asociados con la respuesta, se asoció de forma significativa tanto con el  $\Delta$ DAS28 como con la respuesta EULAR.

**Tabla 41.** SNPs candidatos identificados por Liu et al, analizados en función del  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR en la cohorte española

SNP	CHR	Genes	Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P R. EULAR	OR (IC 95%)
rs983332	1	LMO4	A (0.24)	0,096	3,84E-01	7,36E-01	1,07 (0,72-1,58)
rs928655	1	GBP6	G (0.25)	-0,042	7,00E-01	9,80E-01	1.01 (0,68-1,48)
rs13393173	2	LASS6	A (0.18)	-0,024	8,32E-01	2,52E-01	0.78 (0,51-1,19)
rs437943	4	CENTD1	G(0.24)	0,073	4,84E-01	6,09E-02	0,69 (0,47-1,02)
rs10945919	6	QKI	G(0.35)	-0,12	2,34E-01	4,87E-01	1,13 (0,80-1,61)
rs854555	7	PONI	A(0.29)	0,019	8,55E-01	1,79E-01	0.78 (0,54-1,12)
rs854548	7	PONI	A(0.15)	0,12	3,22E-01	8,48E-02	0.67 (0,42-1,06)
rs854547	7	PONI	G(0.31)	-0,013	9,01E-01	3,98E-01	0.86 (0,60-1,23)
rs7046653	9	IFNK	A(0.20)	0,061	6,25E-01	9,05E-01	1.03 (0,67-1,56)
rs868856	9	MOBKL2B	A(0.34)	-0,0053	9,58E-01	3,94E-01	1.17 (0,82-1,66)
rs774359	9	C9orf72	C (0.30)	-0,056	5,82E-01	4,13E-01	1.17 (0,81-1,69)
rs2814707	9	MOBKL2B	A (0.29)	-0,023	8,25E-01	4,93E-01	1,14 (0,78-1,65)
rs3849942	9	C9orf72	A (0.27)	-0,021	0,84E-01	7,59E-01	1.06 (0,73-1,55)
rs6028945	20	MAFB	T (0.15)	-0,0053	9,69E-01	4,40E-01	1.21 (0,75-1,96)
rs6138150	20	CST5	T (0.15)	0,14	2,93E-01	8,51E-01	0.97 (0,60-1,52)
rs6071980	20	MAFB	C (0.18)	-0,02	8,74E-01	2,93E-01	1.27 (0,81-1,98)

**CHR:** cromosoma, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** coeficiente de correlación, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

## 5.2.- Estudio de replicación de loci candidatos del estudio publicado por Plant et al.

En el estudio publicado por Plant et al se identificaron 7 SNPs asociados con la respuesta determinada por el  $\Delta$ DAS28 a los 6 meses de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . En nuestro estudio se analizó la asociación entre estos 7 SNPs y el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento. Para la validación de los 7 SNPs utilizamos la imputación debido a que en el microarray *Illumina Quad610* no estaban disponibles.

Tal y como se observa en la tabla 42, en nuestro estudio no se identificó ninguna asociación estadísticamente significativa ( $P < 7E-03$ ) con ninguno de los SNPs estudiados.

**Tabla 42.** SNPs candidatos identificados por Plant et al analizados en función del  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR en la cohorte española. (SNP=7)

SNP	CHR	Genes	Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P EULAR	OR (IC 95%)
rs12081765	1	LMX1A	A (0,53)	-0,14	1,71E-01	3,06E-02	1,45 (1,03-2,02)
rs4694890	4	TEC	A (0,46)	-0,089	5,53E-01	1,86E-01	0,80 (0,57-1,12)
rs1532269	5	PDZD2	C (0,44)	-0,13	3,77E-01	9,25E-02	1,34 (0,95-1,88)
rs17301249	6	EYA4	C (0,15)	-0,070	3,34E-01	3,85E-01	1,23 (0,77-1,97)
rs1350948	11	LOC196188	A (0,16)	0,058	6,01E-01	8,72E-01	1,04 (0,66-1,64)
rs7305646	12	LOC387845	C (0,51)	0,066	4,52E-01	5,78E-01	1,10 (0,79-1,54)
rs7962316	12	MRPL42	G (0,47)	-0,10	2,89E-01	4,19E-01	1,15 (0,82-1,61)

**CHR:** cromosoma, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** coeficiente de correlación, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

### 5.3.- Estudio de replicación de loci candidatos del estudio publicado por Krintel et al

El tercer y último estudio publicado hasta ahora y cuyos resultados se han utilizado en el estudio de replicación del presente proyecto, fue publicado en el año 2012 por Krintel et al. Como se observa en el tabla 43 se seleccionaron los 10 SNPs asociados con el  $\Delta$ DAS28 y los 10 SNPs asociados con la respuesta EULAR. Teniendo en cuenta la corrección por tests múltiples de Bonferroni, se consideró como asociación estadísticamente significativas a las asociaciones con un valor de  $P < 5E-03$ .

En relación a los SNPs candidatos identificados en relación con el  $\Delta$ DAS28, en nuestra muestra no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa con ninguno de los SNPs estudiados. Sin embargo, cuando se analizaron los SNPs asociados con la respuesta EULAR, se observó que el SNP rs11045392 cercano al gen *PDE3A* (*fosfodiesterasa 3A inhibida por el cGMP*) alcanzó una asociación estadísticamente significativa ( $P=4,28E-03$ ) en relación con el  $\Delta$ DAS28. También se observó una asociación estadísticamente significativa con la respuesta EULAR que en nuestro estudio consideraba como respondedores a los buenos y moderados respondedores ( $P=2,25E-03$  (OR(IC95%)=1,74 (1,24-2,45)). Tal y como se observa en la tabla 44 esta asociación aumentan al considerar como en el estudio de Krintel et al, solo a los buenos respondedores vs los no respondedores ( $P_{nominal}=1,02E-04$ ,  $P_{corregida}=1,02E-03$ , OR (IC95%)=2,25 (1.491-3.409)).

El SNP rs3794271 ubicado en el gen *SLCO1C1* también presentó una asociación estadísticamente significativa con el  $\Delta$ DAS28 ( $P=3,41E-03$ ) y con la respuesta EULAR considerado a los buenos y moderados respondedores EULAR vs los no respondedores ( $P=2,9E-03$ , OR (IC95%)=0,68 (1,19-2,36)). Tal y como se observa en la tabla 44 esta asociación también aumentaba al considerar solo a los buenos respondedores vs los no respondedores como en el estudio de Krintel ( $P_{nominal}=1,06E-04$ ,  $P_{corregida}=1,06E-03$ , OR (IC95%)=2.26 (1.49-3.42)).

**Tabla 43.** SNPs candidatos identificados por Krintel et al analizados en función del  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR en la cohorte española. (SNP=20)

SNP	CHR	Genes	Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P EULAR	OR (IC 95%)
rs885814	1	ALPL	T (0,33)	-0,087	5,79E-01	4,08E-01	1,16 (0,81-1,67)
rs885813	1	ALPL	C (0,55)	-0,20	1,88E-01	2,87E-02	1,45 (1,04-2,04)
rs869179	1	ALPL	A (0,38)	-0,054	7,29E-01	2,54E-02	1,49 (1,05-2,12)
rs1875620	9	C9orf47	A (0,51)	0,0067	9,46E-01	8,30E-01	1,04 (0,74-1,45)
rs11525966	9	C9orf47	T (0,49)	-0,092	3,44E-01	9,01E-01	0,98 (0,70-1,37)
rs2722824	9	TLR4	C (0,29)	0,043	7,71E-01	8,45E-01	0,96 (0,67-1,39)
rs10520789	15	NR2F2	A (0,11)	-0,013	8,95E-01	4,49E-01	1,23 (0,72-2,11)
rs16973982	15	NR2F2	C (0,13)	-0,070	4,63E-01	2,90E-01	1,32 (0,79-2,19)
rs8046065	16	CREBBP	T (0,15)	0,058	5,35E-01	3,27E-01	1,27 (0,78-2,07)
rs11870477	17	MAP2K6	C (0,11)	-0,0059	9,52E-01	7,48E-01	1,09 (0,63-1,88)
rs12698335	7	SHH	A (0,29)	-0,12	2,69E-01	2,98E-01	1,22 (0,84-1,77)
rs16911006	9	ZNF618	A (0,18)	-0,033	7,80E-01	8,85E-01	0,97 (0,63-1,49)
rs6578820	11	ZNF214	G (0,41)	-0,098	2,91E-01	8,52E-01	1,03 (0,73-1,45)
rs717117	11	LRRC55	NA	NA	NA	NA	NA
rs12417609	11	LRRC55	NA	NA	NA	NA	NA
rs11045392	12	PDE3A	T (0,44)	-0,29	4,28E-03	2,25E-03	1,70 (1,21-2,40)
rs3794271	12	SLCO1C1	G (0,43)	-0,30	3,41E-03	2,96E-03	1,68 (1,19-2,37)
rs9301169	13	FAM155A	C (0,21)	-0,030	7,71E-01	3,17E-02	0,65 (0,43-0,96)
rs9539845	13	OR7E156P	C (0,36)	-0,098	3,39E-01	1,37E-01	1,31 (0,91-1,86)
rs17714261	19	ZNF180	C (0,19)	-0,15	2,01E-01	5,55E-01	1,14 (0,74-1,75)

Los primeros 10 SNPs son los SNPs candidatos asociados al  $\Delta$ DAS28. El resto son los 10 SNPs candidatos asociados a la respuesta EULAR, **NA=** SNP no disponible en el microarray Illumina Quad610 ni en la base de datos *HapMap* de referencia. **CHR:** cromosoma, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** coeficiente de correlación, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta.

**Tabla 44.** SNPs candidatos identificados por Krintel et al analizados en función del  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR considerando, a los buenos respondedores vs los no respondedores en la cohorte española

SNP	Cr	Genes	Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P EULAR	OR (IC 95%)
rs12698335	7	SHH	A (0,29)	-0,12	2,69E-01	2,82E-01	1,27 (0,82-1,97)
rs16911006	9	ZNF618	A (0,18)	-0,033	7,80E-01	7,43E-01	1,09 (0,66-1,80)
rs6578820	11	ZNF214	G (0,41)	-0,098	2,91E-01	5,42E-01	1,13 (0,76-1,68)
rs717117	11	LRRC55	NA	NA	NA	NA	NA
rs12417609	11	LRRC55	NA	NA	NA	NA	NA
rs11045392	12	PDE3A	T (0,44)	-0,29	4,28E-03	1,02E-04	2,25 (1,49-3,41)
rs3794271	12	SLCO1C1	G (0,43)	-0,30	3,41E-03	1,06E-04	2,26 (1,49-3,42)
rs9301169	13	FAM155A	C (0,21)	-0,030	7,71E-01	4,17E-01	0,82 (0,52-1,3)
rs9539845	13	OR7E156P	C (0,36)	-0,098	3,39E-01	1,02E-01	1,41 (0,93-2,13)
rs17714261	19	ZNF180	C (0,19)	-0,15	2,01E-01	2,34E-01	1,37 (0,81-2,29)

NA= SNP no disponible en el *microarray Illumina Quad610* ni en la base de datos *Hapmap* de referencia. CHR: cromosoma, MAF: frecuencia del alelo menor,  $\beta$ : coeficiente de correlación, OR: odds ratio estimado a la no respuesta

#### 5.4.- Estudio de replicación de loci candidatos asociados al riesgo de desarrollar AR o involucrados con la patogenia de la AR

Se realizó el estudio de replicación de los SNPs candidatos analizados por Cui et al, previamente identificados como SNPs de susceptibilidad a desarrollar la AR. Se incluyeron en el análisis 31 SNPs de riesgo para desarrollar AR incluidos en el artículo anteriormente citado y se analizó la asociación de estos SNPs con el  $\Delta$ DAS28 y con la respuesta EULAR (buenos y moderados respondedores vs no respondedores) a las 12 semanas del tratamiento. Estos resultados se presentan en la tabla 45.

Se realizó la corrección de Bonferroni para establecer el punto de corte del valor de P estadísticamente significativo. Para esta replicación se consideró una asociación estadísticamente significativa a las asociaciones con un valor de  $P < 1E-03$ .

En nuestro estudio ningún SNPs, incluyendo el SNP rs10919563 del gen *PTPRC* asociado a la respuesta al anti-TNF $\alpha$  en el estudio de Cui et al, se asoció de forma significativa con el  $\Delta$ DAS28 y con la respuesta EULAR. Sin embargo se observó que el SNP rs6457617 situado en el gen *HLA-DR4* presentó una asociación con el  $\Delta$ DAS28 aunque de forma no significativa ( $P=3,91E-03$ ). No obstante esta asociación desapareció cuando se realizó el análisis en relación a la respuesta EULAR.

**Tabla 45.** SNPs asociados con el riesgo de desarrollar AR y la asociación con el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento. (SNP=31)

SNP	CHR		Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P EULAR	OR (IC 95%)
rs10919563	1	PTPRC	A(0,09)	0,18	2,12E-01	2,94E-01	0.74 (0,42-1,30)
rs11586238	1	CD58	G(0,21)	-0,045	6,85E-01	9,98E-01	0,99 (0,67-1,50)
rs2476601	1	PTPN22	T(0,16)	-0,10	4,37E-01	1,86E-01	1,37 (0,86-2,18)
rs3890745	1	TNFRSF14	G(0,34)	-0,13	1,99E-01	1,51E-01	1,30 (0,91-1,86)
rs13031237	2	REL	A (0,38)	-0,060	5,37E-01	9,07E-01	1,02 (0,72-1,44)
rs3087243	2	CTLA4	A(0,44)	0,022	8,12E-01	5,95E-01	0,91 (0,65-1,28)
rs1980421	2	CD28	A(0,29)	0,199	4,25E-02	1,78E-01	0,78 (0,54-1,12)
rs11889341	2	STAT4	T(0,23)	-0,019	8,50E-01	1,17E-01	0,73 (0,49-1,08)
rs4535211	3	PLCL2	A(0,50)	-0,12	2,17E-01	3,83E-01	1.16 (0,83-1,62)
rs231707	4	TNIP2	A(0,16)	0,046	7,05E-01	8,96E-01	0,97 (0,61-1,53)
rs6822844	4	IL2-IL21	T(0,13)	0,029	8,42E-01	1,83E-01	1,41 (0,85-2,34)
rs1341239	6	PRL	A(0,34)	-0,042	6,79E-01	7,35E-01	1.06 (0,74-1,52)
rs6920220	6	TNFAIP3	A(0,23)	0,23	4,53E-02	9,29E-01	1,02 (0,68-1,51)
rs548234	6	PRDM1	G (0,37)	-0,094	3,55E-01	5,02E-01	1,13 (0,79-1,59)
rs4947332	6	HLA*0101	NA	NA	NA	NA	NA
rs6457617	6	DR4	G(0,32)	-0,29	3,91E-03	8,69E-01	1,03 (0,72-1,48)
rs3817964	6	HLA*0401	A(0,076)	0,23	2,16E-01	8,72E-01	1,05 (0,56-1,99)
rs394581	6	TAGAP	C(0,30)	-0,0051	9,60E-01	2,45E-01	1.24 (0,86-1,79)
rs2621377	6	HLA*DPB1	G(0,44)	-0,087	3,69E-01	7,67E-01	1,05 (0,75-1,47)
rs13207033	6	TNFAIP3	A(0,24)	0,047	6,51E-01	2,73E-01	0,80 (0,55-1,19)
rs11761231	7	PODXL	T(0,32)	-0,043	6,80E-01	9,81E-01	1,00 (0,70-1,44)
rs42041	7	CDK6	G(0,33)	-0,014	8,87E-01	6,25E-01	0,91 (0,64-1,30)
rs13277113	8	BLK	A(0,24)	-0,12	3,23E-01	2,70E-01	1,25 (0,84-1,86)
rs2812378	9	CCL21	G(0,28)	0,13	2,06E-01	3,02E-01	0,82 (0,57-1,19)
rs3761847	9	TRAF1-C5	G(0,41)	0,031	7,48E-01	6,65E-01	0,93 (0,66-1,30)
rs2104286	10	IL2RA	G(0,15)	0,26	3,16E-02	2,29E-01	0,75 (0,47-1,20)
rs4750316	10	PRKCQ	C(0,20)	-0,19	1,05E-01	2,71E-01	1,27 (0,83-1,94)
rs540386	11	TRAF6	T(0,14)	0,018	8,97E-01	8,48E-01	1,05 (0,65-1,70)
rs4810485	20	CD40	T(0,23)	0,15	1,62E-01	4,16E-01	0,85 (0,57-1,26)
rs3218253	22	IL2RB	A(0,27)	-0,079	4,49E-01	3,70E-01	0,84 (0,58-1,23)

**NA=** SNP no disponible en el *microarray Illumina Quad610* ni en la base de datos *Hapmap* de referencia. **CHR:** cromosoma, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** coeficiente de correlación, **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta



El segundo estudio cuyos resultados se incluyeron en el estudio de replicación fue el publicado por Potter et al. Se analizó la asociación de los 9 SNPs involucrados en la vía de señalización de *NFkB* y en la función del TLR que estos autores identificaron como SNPs candidatos asociados con el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR.

Tal y como se observa en la tabla 46 en nuestro estudio ninguno de los 9 SNPs anteriormente asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  presentó una asociación significativa ( $P < 0,005$ ) en ninguno de los modelos utilizados para el análisis.

**Tabla 46.** SNPs identificados en el estudio de Potter et al y su asociación según el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento.

SNP	CHR	Genes	Alelo (MAF)	$\beta$	P $\Delta$ DAS28	P EULAR	OR (IC 95%)
rs2206593	1	<i>PTGS2</i>	NA	NA	NA	NA	NA
rs7744	3	<i>MyD88</i>	G (0,13)	-0,25	6,31E-02	5,94E-01	1,14 (0,70-1,88)
rs2289318	4	<i>TLR-2</i>	G (0,12)	0,18	1,76E-01	2,26E-01	0,73 (0,44-1,21)
rs11096957	4	<i>TLR-10/1/6</i>	C (0,48)	-0,1	2,71E-01	4,52E-01	1,14 (0,81-1,59)
rs11986055	8	<i>IKKB</i>	NA	NA	NA	NA	NA
rs11591741	10	<i>CHUK</i>	C (0,48)	-0,084	3,41E-01	7,17E-01	1,06 (0,76-1,49)
rs11541076	12	<i>IRAK-3</i>	A (0,11)	0,033	8,07E-01	1,99E-01	0,72 (0,43-1,19)
rs3136645	19	<i>NFkBIB</i>	C (0,27)	-0,032	7,58E-01	7,07E-01	0,93 (0,64-1,36)
rs9403	19	<i>NFkBIB</i>	C (0,35)	0,074	4,33E-01	1,55E-01	0,78 (0,55-1,10)

**NA=** SNP no disponible en nuestro microarray Illumina Quad610 ni en la base de datos *Hapmap* de referencia.  
**CHR:** cromosoma, **MAF:** frecuencia del alelo menor,  **$\beta$ :** coeficiente de correlación **OR:** odds ratio estimado a la no respuesta

---

## DISCUSION

---

## 1.- Características de los sujetos de estudio

En los últimos años los fármacos con acción anti-TNF $\alpha$  han revolucionado en el tratamiento de la AR. La disponibilidad de terapias biológicas específicas contra dianas terapéuticas consideradas relevantes en el proceso patogénico de la AR ha modificado el curso de la enfermedad estableciéndose como un objetivo terapéutico principal la remisión clínica o una mínima actividad inflamatoria. Sin embargo, entre un 20 a 40% de pacientes no responden a estos fármacos e incluso entre los que responden es frecuente que dejen de ser eficaces con el tiempo <sup>(348)</sup>.

Actualmente existen varios motivos de preocupación con respecto a la utilización de estos fármacos, uno de ellos es la presentación de efectos adversos indeseables que en algunas ocasiones pueden llegar a ser graves y el otro es el elevado coste que representan estos fármacos, limitando en muchas ocasiones su indicación <sup>(349)(190)(350) (351)</sup>.

Es por este motivo que existe la necesidad de identificar biomarcadores de respuesta a estos fármacos que permitirían optimizar el tratamiento en estos pacientes evitando en algunas ocasiones el riesgo de presentar efectos adversos y los costes innecesarios asociados terapias ineficaces.

En el presente proyecto que incluye 628 pacientes con AR se han identificado biomarcadores epidemiológicos, clínicos y serológicos de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . De estos 628 pacientes, 361 fueron incluidos en el estudio de biomarcadores genéticos. Para dicho estudio se realizó un estudio de asociación del genoma completo y se analizaron los resultados utilizando tres estrategias diferentes a fin de identificar los marcadores genéticos asociados con la respuesta. A continuación se comentan los resultados del presente proyecto.

### 1.1.- Características globales

La cohorte estudiada en el presente proyecto puede ser considerada como una cohorte representativa de la población española con artritis reumatoide y que recibe tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Esta consideración deriva básicamente de dos conceptos. Por una parte, puede ser considerada representativa porque esta constituida a partir de la participación de múltiples investigadores clínicos (i.e. reumatólogos) que realizan su trabajo en distintos hospitales universitarios distribuidos de forma homogénea por el territorio español. Los centros participantes se sitúan a lo largo de la geografía española, de manera que queda representada la población del norte, centro y sur de la península. La selección e inclusión en el presente proyecto de los pacientes con AR que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$  no esta sujeta a ningún criterio geográfico restrictivo y todos los pacientes con AR del IMIDBiobank que cumplen los criterios de inclusión formar parte de la presente cohorte. Por otra parte, todos los investigadores participantes utilizan el consenso de la SER <sup>(119)</sup> para la indicación y seguimiento de los pacientes que reciben terapias biológicas, por lo que no es de esperar que existan aspectos diferenciales que distorsionen la representatividad de la muestra. En cualquier caso es inte-

resante comparar las principales características de nuestra cohorte con los datos publicados por la propia SER (i.e. registro BIOBADASER) y los de otros registros internacionales de referencia para evidenciar si nuestra muestra presentase desviaciones sustanciales.

En este sentido hemos comparado las principales características de nuestra muestra con los datos disponibles de los tres registros europeos más importantes, el registro británico BSRBR (*British Society for Rheumatology Biologics Register*), el registro alemán RABBIT (*RA-Observation of Biologic therapy*) y el registro español de biológicos en reumatología de la propia SER, el registro BIOBADASER, tal y como se observa en la tabla 47.

**Tabla 47.** Características epidemiológicas y clínicas de la presente cohorte y las de tres registros internacionales

Variables		Proyecto de tesis	BIOBADASER	BSRBR*	
<b>Género</b>	Femenino	83%	72%	76%	78%
<b>Tabaco</b>	Fumador	156/598 (26%)	15%	22%	23%
	Exfumador	109/598 (28%)	-	-	-
	No Fumador	333/598 (55%)	-	60%	47%
<b>FR</b>	+	489/625 (78%)	90%	65%	81%
<b>anti-CCP</b>	+	431/592 (69%)	-	-	-
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		53 $\pm$ 12,0	54 $\pm$ 13	56 $\pm$ 12	54 $\pm$ 12
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>		9 (2-16)	9 (4-15)	12 (6-19)	9 (5-16)
<b>DAS28 (SB)</b>		5,5 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 1,3	6,6 $\pm$ 1,0	5,8 $\pm$ 1,2

\***BSRBR:** British Society for Rheumatology Biologics Register, \*\***RABBIT:** RA-Observation of Biologic therapy, Datos extraídos del artículo de Curtis et al (2011).

En el BSRBR hasta la fecha están incluidos aproximadamente unos 12.000 pacientes que iniciaron una terapia anti-TNF $\alpha$  (IFX, ETA y ADA) y 1.100 pacientes que iniciaron tratamiento con RTX. En relación a este registro debe tenerse en cuenta que en Gran Bretaña menos del 10% de los pacientes con AR recibe tratamiento biológico debido a que existe un criterio muy riguroso (DAS28 $>$ 5,1) para el inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  <sup>(352,353)</sup>.

En Alemania no se ha definido una guía para el inicio del tratamiento con terapias biológicas, sin embargo existen una serie de recomendaciones que indican el inicio de la terapia biológica en aquellos pacientes que presentan una elevada actividad de la enfermedad y que hayan fallado al menos a un FAME, incluido el MTX. Se estima que en Alemania entre el 5 y el 10% de los pacientes con AR realizan

terapia biológica. En el registro RABBIT están incluidos más de 5.000 pacientes con terapia biológica incluido los fármacos anti-TNF $\alpha$  <sup>(352,354,355,356)</sup>.

El registro español BIOBADASER es un registro no solo de pacientes con AR, sino también de otras enfermedades reumáticas inflamatorias en las que en su régimen de tratamiento se incluye una terapia biológica. Los pacientes son introducidos en el registro al iniciar la primera terapia biológica. La AR-GUIPCAR recomienda el inicio de la terapia biológica en aquellos pacientes con AR que presentan un DAS28 >3,2 después de alcanzar la dosis máxima tolerable de al menos un FAME, como mínimo el MTX. El porcentaje de pacientes con AR tratados con terapia biológica en España se sitúa aproximadamente entre el 10 y el 20% <sup>(352)</sup>.

La principal diferencia entre los tres registros radica en la propia indicación del inicio de la terapia anti-TNF $\alpha$  y en el hecho de que pueden incluirse o no otras enfermedades. Sin embargo los datos facilitados por las tres cohortes nos permiten realizar comparaciones directas. Los tres registros se asemejan en la distribución del género de los pacientes de manera que en base a la mayor prevalencia de AR en el género femenino se observa un mayor número de pacientes mujeres que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Sin embargo en nuestra cohorte este porcentaje es más elevado que el reportado en los otros tres registros.

Una de las diferencias más evidentes entre nuestra cohorte y las de los tres registros se observa en relación al porcentaje de pacientes fumadores. En nuestra muestra se observa un porcentaje superior de pacientes fumadores activos que el reportado en los tres registros y esta diferencia es más evidente si la comparamos con el registro español. Es preciso señalar que ninguno de los tres registros consideran en el análisis descriptivo a los pacientes exfumadores. En relación al consumo de alcohol y el nivel de estudio de los pacientes no existen datos disponibles en ninguno de los tres registros. En estudios descriptivos se considera que el consumo de alcohol en pacientes con AR tratados con FAMES es en general menor que en la población general ya que el paciente en la mayoría de los casos limita el consumo de alcohol debido a la recomendación de evitar su consumo con el uso de fármacos hepatotóxicos como el MTX. En contraste con estos datos generales reportados en la literatura en nuestra cohorte hemos observado un mayor porcentaje de pacientes que consumen alcohol. No obstante tal y como se describe la en el apartado de la metodología, la intensidad del consumo de alcohol no ha sido considerada en nuestro estudio.

En relación a las características clínicas de nuestra muestra podemos también observar en la tabla que en el registro británico los pacientes presentaban un DAS28 a la semana basal (i.e. al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ ) más elevado que el observado en nuestra cohorte y en los demás registros. Esta diferencia esta directamente relacionada con el criterio tan restrictivo descrito previamente para iniciar el tratamiento biológico en Gran Bretaña.

El relación a la presencia o no de autoanticuerpos, el porcentaje de pacientes con FR positivo varia entre las cuatro cohortes. Destaca un porcentaje muy elevado entre los pacientes anotados en el registro español que es claramente superior que el descrito en la mayoría de estudios para la AR en general. El 78% observado en nuestra corte es muy similar al descrito en el registro alemán (81%) y en ambos casos es ligeramente superior al observado en la cohorte británica. En cualquier caso el porcentaje de pacientes con FR positivo observado en nuestra cohorte esta en relación al descrito en pacientes con AR en general y en distintas poblaciones <sup>(352,353,354,355)</sup>. En relación a la presencia de anticuerpos anti-CCP no podemos realizar comparaciones por no disponer de esta información en ninguno de los registros previamente comentados. Este dato no esta disponible muy posiblemente debido a que cuando se iniciaron estos registros al inicio de la primera década del 2000 estos anticuerpos no habían sido incorporados aun en la práctica clínica. Nuestra cohorte se inició en el año 2007 y la anotación de esta variable serológica ya se contemplaba de forma sistemática en la práctica clínica. En la población general de pacientes con AR el porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos oscila entre el 50% y el 80% <sup>(89, 357, 358, 359)</sup> situándose el % de nuestra cohorte en dicho rango. En base a esta consideración se puede postular que la presencia de anticuerpos anti-CCP positivos no representa ningún criterio que, al menos en la población española de pacientes con AR, implique una mayor indicación de terapia anti-TNF $\alpha$  en estos pacientes.

Otros datos interesantes para establecer comparaciones son los años de evolución de la enfermedad y la edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ . En relación a los años de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento observamos que el valor de la media de la edad es de 9 años en tres de las cuatro cohortes. Esta coincidencia es llamativa pero no permite más aseveraciones que la igualdad y destacar los 12 años de evolución media de la enfermedad en la cohorte británica. Sin embargo si podemos apreciar una mayor diferencia en relación a la desviación estándar entre las cuatro cohortes, de tal manera que en nuestra cohorte el limite inferior del rango es de 2 y por ejemplo en la cohorte británica es de 6. Esta diferencia es suficiente como para extrapolar que en nuestra cohorte y por tanto posiblemente en el territorio español, la terapia biológica con fármacos anti-TNF $\alpha$  se inicia en fases más tempranas de la enfermedad y por tanto también es de esperar que los resultados de eficacia sean superiores. Está ampliamente establecido que cualquier tipo de tratamiento, sean FAMES o terapias biológicas, si se inicia en fases mas tempranas de la enfermedad (i.e. AR de reciente comienzo) la eficacia y el pronóstico a largo plazo es claramente superior <sup>(118, 119, 117)</sup>. En relación a la edad al inicio de la terapia biológica también se observa un valor de la media de la edad ligeramente inferior en la población española (i.e. nuestra cohorte y la registrada en BIOBADASER). Este dato esta en consonancia con los datos comentados en la población española de una indicación de estas terapias en fases menos evolucionadas de la enfermedad, en formas menos activas y por tanto con más probabilidad de revertir el proceso inflamatorio, y en pacientes de menor edad. Esta constatación de una determinada práctica clínica, altamente consensuada y claramente más efectiva, nos permite afirmar que la cohorte de pacientes aquí estudiada posee las características idóneas para el estudio de biomarcadores de respuesta al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide.

## 1.2.- Características en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

Al analizar las variables epidemiológicas, serológicas y clínicas, en cada uno de los grupos de tratamiento (pacientes que han recibido tratamiento con IFX, pacientes que han recibido tratamiento con ETA y pacientes que han recibido tratamiento con ADA) no se observan diferencias en relación al género, nivel de estudios, consumo de alcohol y tabaco, presencia o ausencia de FR y anticuerpos anti-CCP, edad y años de evolución al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  y número de comorbilidades previas. A pesar de no ser un estudio randomizado, si no basado en la práctica clínica, observamos que los tres grupos de tratamiento tienen una distribución similar para estas variables y que no existen desviaciones significativas en relación al conjunto global de la muestra. Esta característica es fundamental para poder evaluar la presencia de biomarcadores en función del tratamiento.

En relación al número de FAMES previos y al DAS28 a la semana basal si observamos diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento. Los pacientes que recibieron IFX tenían el antecedente de haber recibido tratamiento con un mayor número de FAMES que los pacientes que habían recibido tratamiento con ETA y ADA. Así mismo, los pacientes que recibieron IFX presentaban un DAS28 a la semana basal significativamente más elevado que en los otros dos grupos de tratamiento. Estas diferencias no pueden ser atribuidas a variaciones significativas en los años de evolución de la enfermedad entre los tres grupos tal y como hemos comentado. Es muy probable que estas diferencias sean debidas a que IFX fue el primer fármaco que se utilizó en muchos centros y al inicio solo estaba indicado en pacientes muy refractarios, es decir en pacientes que a pesar de haber utilizado varios FAMES presentaban una elevada actividad de la enfermedad. Los valores mas bajos del número de FAMES previos y de DAS28 a la semana basal corresponden al grupo de pacientes tratados con ADA que se comercializó tres años mas tarde y en un periodo en que la estrategia de inicio de tratamiento había cambiado sustancialmente.

## 2.- Biomarcadores no genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

### 2.1.- Respuesta terapéutica en función del tratamiento anti-TNF $\alpha$

La primera y más importante variable clínica analizada en nuestra cohorte de pacientes con AR ha sido la respuesta clínica al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Hemos observado que el 74% de pacientes alcanzaban el criterio EULAR de buenos y moderados respondedores y que el 26% de los pacientes se clasificaban como no respondedores. Cuando analizamos la respuesta en relación al tratamiento recibido, se observa que los pacientes tratados con ETA presentan una mejor respuesta en comparación con los pacientes tratados con los demás tratamientos. En cambio los pacientes tratados con IFX presentaron una peor respuesta en comparación con los demás fármacos. Para la correcta interpretación de estos resultados pasaremos a comentar aquellos registros y meta-análisis que engloban datos de respuesta a terapia biológica más importantes publicados hasta la fecha.

El primer registro analizado es el registro británico citado ya previamente, el registro BSRBR, que incluyó 2.879 pacientes con AR, 1.267 tratados con ETA y 1.612 tratados con IFX. En este estudio se analizó la respuesta EULAR al tratamiento con ambos fármacos anti-TNF $\alpha$  a los 6 meses de iniciado del tratamiento. En este contexto ya observamos que la evaluación de la respuesta fue más tardía que en nuestra cohorte en la que se determinó la respuesta terapéutica a los tres meses de tratamiento. No obstante y a pesar de esta diferencia en el registro británico se observó un porcentaje de pacientes respondedores y no respondedores muy similar al observado en nuestra cohorte (68% y 32%, respectivamente). De todas formas cabe constatar que a diferencia de nuestros resultados, no se observaron diferencias significativas entre la respuesta clínica y el tratamiento anti-TNF $\alpha$  administrado, IFN vs ETA en este caso.

Un segundo registro de interés que analiza la eficacia de los fármacos anti-TNF $\alpha$ , es el registro italiano LORHEN (*Lombardy Rheumatology Network*) que incluyó 821 pacientes con AR tratados con los tres anti-TNF $\alpha$  que se comercializaron en primer lugar, IFX, ETA y ADA. En este estudio se evaluó la respuesta clínica utilizando los mismos criterios EULAR que en nuestra cohorte y en la cohorte británica, pero de nuevo la evaluación de la respuesta se realizó de forma más tardía, a los 12 meses de iniciado el tratamiento. Se observó que el 81.4% de los pacientes eran respondedores (i.e. buenos y moderados respondedores según criterio EULAR) y que el 18.6% eran no respondedores al año de iniciado el tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . Al igual que en el registro británico, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento anti-TNF $\alpha$  y la respuesta clínica<sup>(360)</sup>.

El registro DANBIO (*Nationwide Registry of biological therapies in Denmark*) publicó sus primeros datos en el año 2010. Se incluyeron 1.839 pacientes con AR en tratamiento anti-TNF $\alpha$  y se comparó la eficacia de los tres fármacos anti-TNF $\alpha$  más utilizados a los 6 y 12 meses. A diferencia de nuestro estudio y de los registros comentados anteriormente en este registro se utilizaron como parámetros de valoración de la eficacia clínica la respuesta ACR70, la respuesta EULAR, la re-



misión valorada por CDAI y la remisión considerando el criterio DAS28 $<2,6$ . Coincidiendo con nuestro estudio, se objetivó una diferencia significativa en relación a la respuesta EULAR, siendo el IFX el fármaco anti-TNF $\alpha$  con un mayor número de pacientes no respondedores. Sin embargo a diferencia de los datos de nuestro estudio el tratamiento con ADA fue el tratamiento con mayor número de pacientes respondedores <sup>(361)</sup>.

En otro estudio procedente del registro holandés DREAM (*Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring*) se incluyeron 770 pacientes con AR y tratamiento anti-TNF $\alpha$  y se evaluó la respuesta a los 12 meses de iniciado el tratamiento utilizando el criterio de respuesta EULAR. En este estudio se observó al igual que en nuestra cohorte y la del registro DANBIO, que el grupo de pacientes tratados con IFX presentaba una peor respuesta con respecto al grupo de pacientes tratados con ADA o con ETA, y que el grupo de pacientes tratados con ADA tenía una eficacia clínica similar al grupo de pacientes que había recibido tratamiento con ETA <sup>(362)</sup>.

Es preciso comentar que la diferencia más llamativa entre los datos aportados por estos registros y los datos relativos a nuestra cohorte es en relación al tiempo en que se considera relevante la valoración de la respuesta clínica. Existen múltiples controversias en relación a establecer cual es el momento más adecuado para realizar la primera valoración de la respuesta clínica después de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . El ACR <sup>(363)</sup> recomienda por ejemplo realizar la primera valoración clínica a los 3 meses de iniciado el tratamiento. Este punto coincide con la guía de la BSR (*The British Society for Rheumatology*) que recomienda realizar la primera valoración de la respuesta al tratamiento a los tres meses de su inicio y en los pacientes no respondedores recomienda repetir la valoración a los 6 meses. En caso de no alcanzarse el objetivo terapéutico a los 6 meses la guía también recomienda retirar el tratamiento anti-TNF $\alpha$  y cambiar de estrategia terapéutica <sup>(364)</sup>.

La guía AR- GUIPCAR <sup>(119)</sup> recomienda valorar el fracaso terapéutico o la toxicidad del fármaco, en un plazo máximo de tres meses y, en consecuencia, considerar el cambio de tratamiento. Debido al elevado consenso que existe entre los reumatólogos del territorio español y su adhesión a la guía de expertos de la SER, al inicio del proyecto PSE IMID-Kit la comisión clínica de artritis reumatoide consideró elaborar la sección de terapia biológica del protocolo clínico de acuerdo a los criterios establecidos por la SER y que coincidían en todos los centros participantes con lo que se lleva a cabo en su práctica clínica diaria. En cualquier caso la recomendación de la SER y la incorporada en nuestra cohorte coinciden con la recomendación de la ACR y de la BSR en considerar los tres meses de iniciado el tratamiento como el periodo más idóneo para evaluar la respuesta clínica. Esto no implica que tal y como se ha constatado en determinados registros se utilicen periodos de tiempo mas prolongados para evaluar la respuesta clínica al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

Hasta la fecha se han publicado distintos meta-análisis que integran múltiples estudios randomizados cuyo objetivo es analizar la eficacia de los distintos tratamientos anti-TNF $\alpha$  en la AR. Uno de estos meta-análisis, probablemente el más amplio, incluyó 26 estudios randomizados de pacientes con AR refractarios al

tratamiento con MTX y que iniciaron tratamiento con terapias biológicas (ADA (n=2.354), ETA (n=1.151), IFX (n=704) y anakinra (n=1.039). En este meta-análisis se incluyeron estudios que evaluaban la respuesta terapéutica utilizando distintos criterios, el índice DAS28, los criterios de Paulus, la progresión radiográfica, la capacidad funcional y la calidad de vida, todos ellos al año de iniciado el tratamiento. En relación a la eficacia de los tratamientos anti-TNF $\alpha$  valorada según la respuesta ACR, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con IFX, ETA o con ADA<sup>(365)</sup>.

En un segundo meta-análisis se incluyeron 4 estudios randomizados y 673 pacientes con AR tratados también con los tres principales anti-TNF $\alpha$  (IFX (n=340), ADA (n=274) y ETA (n=30) y se analizó la respuesta clínica según los criterios de respuesta ACR20 y ACR50 a los 6 meses del inicio del tratamiento. En este meta-análisis tampoco se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento<sup>(366)</sup>.

Sin embargo en un tercer meta-análisis publicado por Lee et al<sup>(367)</sup> incluía tres estudios randomizados que comparaban la eficacia según la respuesta ACR de un fármaco anti-TNF $\alpha$  asociado a MTX con el tratamiento con MTX en monoterapia. Se incluyeron pacientes tratados con IFX (n=86), ETA (n=231) y ADA (n=207) en combinación con MTX. En este meta-análisis se observó una menor eficacia en el grupo de pacientes tratados con ETA en comparación con el grupo de pacientes tratados con IFX y con ADA. No obstante en este estudio se debe considerar que los pacientes que recibieron ETA eran pacientes que no habían recibido previamente MTX (*náive* a MTX) y los pacientes que recibieron IFX y ADA eran pacientes en los que había fracasado el tratamiento con MTX (resistentes a MTX). Esta diferencia en los criterios de inclusión de pacientes en un determinado grupo impide realizar cualquier comparación.

Los estudios comentados previamente nos indican que los resultados procedentes de comparaciones indirectas entre estudios clínicos randomizados pueden tener sesgos realmente importantes y que para poder comparar de forma clara la eficacia de los distintos tratamientos anti-TNF $\alpha$  deberían realizarse estudios directos. Los estudios randomizados, controlados, de comparación *head-to-head* de la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  prácticamente no existen. La primera evidencia de una comparación directa de dos agentes biológicos proviene de un estudio no randomizado que incluyó 404 pacientes con AR procedentes de 7 centros suizos y que valoró la eficacia utilizando los criterios de respuesta ACR y EULAR. Se incluyeron pacientes con AR que recibían tratamiento con ETA (n=166), IFX (n=135) y con leflunomida (n=103) y se evaluó la eficacia clínica a los dos años de iniciado del tratamiento. En relación a los fármacos anti-TNF $\alpha$  se observó una mayor eficacia del tratamiento con ETA en relación al tratamiento con IFX a los 3 meses ( $P < 2E-2$ ) y a los 6 meses ( $P < 5E-02$ ) del inicio del tratamiento. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos fármacos a los 12 meses de tratamiento<sup>(368)</sup>. Muy recientemente se han publicado algunos estudios *head-to-head* pero en ambos casos se han realizado con otras terapias biológicas, como por ejemplo el estudio ATTEST (*Abatacept or infliximab versus placebo, a Trial for Tolerability, Efficacy and Safety in Treating rheumatoid*

*arthritis*)<sup>(369)</sup> o el estudio ADACTA (*ADalimumab ACTemrA*)<sup>(370)</sup>.

En el estudio ATTEST se incluyeron 431 pacientes con AR, tratados con ABA, IFX y placebo en combinación con MTX y se evaluó la respuesta a los 6 meses de tratamiento utilizando el  $\Delta$ DAS28, la respuesta EULAR y la respuesta ACR. En este estudio se demostró que ABA e IFX tenían una eficacia clínica similar a lo largo del seguimiento<sup>(369)</sup>.

En el estudio ADACTA que incluyó 326 pacientes con AR tratados con ADA o TCZ, ambos en monoterapia, se valoró la respuesta clínica a los 6 meses determinada por el índice DAS28, los criterios de respuesta ACR, el índice CDAI y el cuestionario HAQ. En este estudio se observó que el tratamiento con tocilizumab en monoterapia tenía una mayor eficacia que el tratamiento con ADA en monoterapia en reducir los signos y síntomas de la AR<sup>(370)</sup>.

En ausencia de este tipo de estudios que analicen la comparación directa de la eficacia clínica entre los tratamientos anti-TNF $\alpha$ , los estudios como el que aquí se presenta que incluyen pacientes no seleccionados, procedentes de la práctica clínica diaria pueden proporcionar resultados orientativos sobre las diferencias de eficacia de estos fármacos, aunque la falta de randomización no permite extraer conclusiones de forma definitiva.

En el presente proyecto se incluyeron 628 pacientes con AR de diferentes consultas externas de Reumatología de los distintos centros participantes en el proyecto PSE IMID-Kit. Se evaluó la respuesta EULAR a las 12 semanas del inicio del tratamiento y al igual que en alguno de los estudios comentados anteriormente, hemos observado una peor respuesta en el grupo de pacientes tratados con IFX y una mejor respuesta en el grupo de pacientes tratados con ETA. No obstante, al no ser un estudio randomizado observamos que existen ciertas diferencias entre los tres grupos de tratamiento lo que verdaderamente pueden influir en la valoración de los resultados finales de eficacia. En relación al número de FAMES recibidos previo al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  observamos que los pacientes tratados con IFX habían recibido un mayor número de FAMES que los pacientes que habían recibido tratamiento con ETA y ADA. Así mismo, los pacientes tratados con IFX presentaban un valor de la media del DAS28 a la semana basal claramente superior al observado en los otros dos grupos de tratamiento. Estos datos sugieren que los pacientes tratados con IFX tenían una forma más grave de la enfermedad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ , o en cualquier caso si que presentaban una AR más activa (determinada por el índice DAS28 a la semana basal) o más evolucionada (determinada por un mayor consumo de FAMES previo al inicio del tratamiento).

## 2.2.- Biomarcadores epidemiológicos de respuesta

La primera variable epidemiológica analizada en relación a la respuesta terapéutica fue el género. En nuestro estudio el género de los pacientes con AR no ha sido identificado como un biomarcador de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  de forma global ni en relación a cada uno de los tratamientos. Estos resultados

coinciden con los resultados de otros estudios como el publicado por Kristensen et al<sup>(246)</sup> que a pesar de haber incluido un mayor número de pacientes (n=1.565) tampoco observaron diferencias significativas entre el género y la respuesta EULAR alcanzada a los 3 y 6 meses de tratamiento. En este sentido, los resultados publicados a partir del registro británico<sup>(231)</sup>, que incluyó 2.879 pacientes con AR tratados con IFX y con ETA, tampoco pudieron demostrar la existencia de una relación entre el género y la respuesta EULAR a los 6 meses de tratamiento.

Un estudio muy interesante es el estudio realizado por Jawaheer et al<sup>(235)</sup> que incluyeron 328 mujeres y 148 hombres con AR temprana ( $\leq 2$  años) y 1.245 mujeres y 408 hombres con AR establecida ( $> 2$  años). En este estudio se analiza una posible asociación entre el género y la respuesta EULAR en función de los años de evolución de la enfermedad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Los autores observaron que el género masculino es un predictor de buena respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ , pero solo en las AR de reciente comienzo ya que en las AR establecidas el comportamiento entre ambos géneros fue similar. Este subtipo de análisis no ha sido reportado en los estudios de Hyrich et al y de Kristensen et al. El valor de la media de los años de evolución en el estudio de Kristensen et al<sup>(246)</sup> fue de 11 años en el grupo de AR de género femenino y de 12 años en el grupo de AR de género masculino. En el estudio de la cohorte británica publicado por Hyrich et al<sup>(231)</sup> solo se presenta el valor medio de los años de evolución de la enfermedad previo al inicio del tratamiento de forma global para toda la cohorte (14 años) y no estratificado por el género. En el presente proyecto debido a los criterios de inclusión definidos para el proyecto PSE IMID-Kit no se incluyeron pacientes con AR de menos de dos años de evolución por lo que este subanálisis no se ha podido realizar. No obstante el estudio de Jawaheer et al<sup>(235)</sup> sugiere la necesidad de llevar a cabo posteriores estudios para determinar si realmente el género puede ser un biomarcador de respuesta en determinados subgrupos de pacientes (i.e. en pacientes con AR de reciente comienzo).

*En nuestra serie no se ha objetivado ninguna asociación entre el género de los pacientes con AR y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

La segunda variable epidemiológica de interés como biomarcador epidemiológico de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  es el nivel de estudios. En el presente proyecto el nivel de estudios se asoció de forma significativa con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR, de forma que los pacientes con un nivel educativo medio-alto presentan una mejor respuesta clínica. Actualmente no existen estudios publicados que evalúen una posible asociación entre el nivel de estudios y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. Ninguno de los estudios comentados en la introducción que evalúan distintas variables epidemiológicas de respuesta incorpora esta información.

En este sentido si que existen numerosos estudios que establecen una clara asociación entre el desarrollo y la gravedad de una determinada enfermedad IMID y el nivel de estudios o estrato social<sup>(371, 372, 373)</sup>.

En el estudio publicado por Bengtsson et al <sup>(372)</sup> se incluyeron 930 pacientes procedentes del registro EIRA (*Epidemiological investigation of Rheumatoid Arthritis*) y se observó que existe una relación entre el nivel de estudios y el riesgo de desarrollar AR. Los individuos sin formación universitaria tenían significativamente más riesgo de desarrollar una AR en comparación con los sujetos con formación universitaria, aunque esta asociación solo se observó en los pacientes con FR positivo.

La aplicabilidad que puede tener este hallazgo en relación al tratamiento anti-TNF $\alpha$  puede establecerse en base a los distintos regímenes de tratamiento. En este sentido ADA y ETA son fármacos de administración subcutánea por lo que el cumplimiento terapéutico depende en gran medida del propio paciente, a diferencia del IFX que se administra por vía intravenosa y el paciente debe acudir al hospital de día. En base a los resultados obtenidos en el presente proyecto y aceptando que existe una relación entre el nivel educativo y la respuesta al tratamiento, estaría indicado iniciar un tratamiento administrado en el hospital de día en aquellos pacientes con un bajo nivel educativo a fin de facilitar la adherencia y el cumplimiento del tratamiento. Nuestros datos no nos indican que exista una relación directa entre la forma de administración y la eficacia clínica, sin embargo la relación objetivada entre el nivel de estudios y la eficacia clínica podría establecerse a través de la vías de administración del fármaco. El cumplimiento del tratamiento es especialmente importante en el caso de enfermedades crónicas como la AR, en las que el grado de progresión de la enfermedad guarda una estrecha relación con el grado de control permanente de la inflamación <sup>(119)</sup>.

En nuestro estudio también hemos observado que el nivel de estudios estaba asociado específicamente con la respuesta al tratamiento con ETA, de manera que los pacientes con un nivel de estudios medio-alto responden mejor que los pacientes con un nivel de estudio básico. Es probable que la administración subcutánea de ETA dos veces a la semana o con la nueva presentación, una vez por semana, requiera una mayor comprensión del régimen de tratamiento y una mayor implicación por parte del paciente. En consecuencia con nuestros resultados, en el momento de iniciar una terapia biológica con fármacos anti-TNF $\alpha$  debe tenerse en cuenta el nivel de estudios a la hora de elegir entre cada uno de los tratamientos anti-TNF $\alpha$ .

*En nuestra serie se ha objetivado una asociación entre el nivel de estudios de los pacientes con AR y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

Una de las variables analizadas más importantes por su reconocida influencia en el desarrollo de la AR, es el hábito tabáquico. En nuestro estudio no se han observado diferencias significativas en relación a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  entre los pacientes con antecedentes de hábito tabáquico y los pacientes que nunca habían fumado antes de iniciar el tratamiento. Sin embargo en el estudio de Hyrich et al <sup>(231)</sup> que incluyó 2.879 pacientes de la cohorte británica, se observó que los fumadores activos en el momento del inicio del fármaco, respondían peor a los 6 meses del inicio del tratamiento con IFX en comparación con los que nunca habían fumado. No obstante en este estudio no se observó una asociación entre el hábito tabáquico y la respuesta al tratamiento con ETA.

Un segundo estudio, publicado por Matthey et al <sup>(241)</sup> se realizó en un grupo de 154 pacientes y se evaluó el efecto de la intensidad del hábito tabáquico determinada por el número de paquetes/año sobre la respuesta al tratamiento con IFX y ETA a los 3 y 12 meses del seguimiento. En este estudio se observó que el hábito tabáquico y sobre todo su intensidad en el momento del inicio del tratamiento estaba asociado a una peor respuesta EULAR a los 3 y 12 meses de seguimiento independientemente del fármaco recibido. Esto coincide con otro estudio publicado recientemente que también valora la intensidad del hábito tabáquico (i.e. paquetes /año) y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  <sup>(374)</sup>.

Por último Abhishek et al <sup>(375)</sup> publicaron un estudio en el que se incluyeron 395 pacientes con AR tratados con IFX, ETA y ADA,. En este estudio se analizó la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento en los pacientes fumadores activos vs los pacientes no fumadores y en los pacientes exfumadores vs los no fumadores. De forma interesante se observó que los pacientes fumadores activos tratados con IFX o con ETA presentaban una peor respuesta con respecto a los pacientes que nunca habían fumado. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes que nunca habían fumado y los pacientes exfumadores. Esto podría explicar la diferencia en relación al hábito tabáquico y el tratamiento con IFX o ETA observada por el estudio de Hyrich et al, ya que en este estudio se estratificó a la población en fumadores activos y no activos sin identificar a los pacientes exfumadores.

Saevasdottir et al <sup>(245)</sup>, publicaron recientemente un estudio en 535 pacientes con AR de reciente comienzo (<12 meses del diagnóstico) tratados con distintos anti-TNF $\alpha$  y analizaron la respuesta EULAR a las 12 semanas del inicio del tratamiento. Los pacientes fueron clasificados en fumadores activos, exfumadores y no fumadores en el momento del diagnóstico de la AR. En este estudio se observó que los pacientes fumadores activos tenían una menor probabilidad de alcanzar una buena respuesta al tratamiento. Los pacientes exfumadores presentaban una probabilidad de alcanzar una buena respuesta muy similar a la de los pacientes no fumadores.

En conjunto estos datos sugieren la importancia de determinar de forma individualizada a que grupo pertenece cada paciente a fin de establecer las recomendaciones más adecuadas. Es de esperar que los efectos del consumo de tabaco sean mayores en los pacientes fumadores activos, donde los componentes tóxicos del humo del cigarrillo están presentes. Sin embargo en un estudio <sup>(244)</sup> de referencia publicado en el año 2006 se observó que la concentración de TNF $\alpha$  liberados por los linfocitos T estimulados de los sujetos ex fumadores no difería de la de los individuos fumadores activos, y que hasta 15 años después de haber suspendido el hábito tabáquico, estos sujetos presentaban valores de TNF $\alpha$  significativamente mayores en comparación con los pacientes no fumadores. Estos datos sugieren que el aumento en la liberación de TNF $\alpha$  por las células T estimuladas puede ser una respuesta prolongada y crónica que puede persistir durante muchos años incluso después de haber abandonado el hábito tabáquico. La asociación entre el TNF $\alpha$  y el hábito tabáquico también ha sido observada por otros estudios realizados que incluyeron individuos sanos <sup>(376,377)</sup>.

Basándonos en estos hallazgos en el presente proyecto hemos agrupado a los pacientes exfumadores con los pacientes fumadores activos. No obstante no hemos objetivado diferencias significativas entre la eficacia clínica del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  y el hábito tabáquico. Esta ausencia de asociación se objetiva también para cada uno de los tres grupos de tratamiento. Se ha observado una asociación aislada entre el hábito tabáquico (pacientes fumadores activos y exfumadores) y una mejor respuesta en los pacientes tratados con ETA. Si embargo esta asociación solo se observó en el análisis univariante y se vio artefactada por el género y la presencia de anticuerpos anti-CCP positivos, tal y como se ha comentado en el apartado de resultados. No obstante, considerando los estudios previamente comentados, se realizó un sub-análisis (datos no presentados en este proyecto) considerando solo a los pacientes fumadores activos vs los pacientes que nunca habían fumado pero tampoco se observó una asociación significativa con la respuesta a los tres meses del inicio del tratamiento con alguno de los tres fármacos anti-TNF $\alpha$  analizados. Aunque en nuestro estudio no hemos observado asociación entre este hábito y la respuesta EULAR, ésta no se puede descartar dada la importancia del hábito tabáquico en la patogenia de la AR. Existe la necesidad de realizar estudios con una estratificación de la población más detallada, considerando además la intensidad del hábito, ya que como se ha descrito, la asociación entre este hábito y la respuesta puede verse sesgada por la estratificación de la muestra y la intensidad de la exposición.

*En nuestra serie no se objetivó una asociación entre el hábito tabáquico y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$*

### 2.3.- Biomarcadores clínicos de respuesta

Tal y como se ha comentado en la revisión de la literatura y en el apartado de la metodología los biomarcadores clínicos analizados en relación a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR han sido: la edad y los años de evolución al inicio del tratamiento, el número de FAMES y de comorbilidades previas y el DAS28 a la semana basal. De todos estos biomarcadores el que ha suscitado un mayor interés es el estudio de la actividad de la AR a la semana basal del inicio de tratamiento determinada por el índice DAS28<sup>(248,249,378)</sup>.

En nuestro estudio el valor del DAS28 a la semana basal no estuvo asociado con la respuesta clínica al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Tanto el grupo de pacientes respondedores como el grupo de pacientes no respondedores presentaban un valor de la media del DAS28 a la semana basal prácticamente superponible,  $5,5 \pm 1,1$  y  $5,4 \pm 1,2$ , respectivamente. No obstante cuando consideramos los distintos tratamientos anti-TNF $\alpha$  de forma individual se observó que en el grupo de pacientes tratados con ADA un DAS28 más elevado a la semana basal estaba asociado con una mayor respuesta EULAR a la semana 12 del inicio del tratamiento. Sin embargo esta asociación no se observó en los otros dos grupos de tratamiento. Al refinar este resultado observamos que en el grupo de pacientes tratados con ADA se detectaron 8 pacientes con valores extremos de DAS28 y que habían presentado una respuesta muy favorable (datos no presentados), motivo por el cual consideramos

que esta asociación “DAS28 y tratamiento específico” puede no ser realmente cierta, a pesar de objetivarse en el análisis multivariante.

Esta ausencia de asociación entre el DAS28 a la semana basal y la eficacia clínica coincide con los resultados reportados en el estudio del registro británico, BSRBR. En esta cohorte no se observó una asociación significativa entre el valor de la media del DAS28 (SB) y la respuesta EULAR a los 6 meses de iniciado el tratamiento, no obstante al analizar este índice por cada uno de sus componentes se observó que los valores elevados de VSG estaban asociados a una peor respuesta <sup>(231)</sup>.

En nuestro estudio no hemos podido realizar este subanálisis por no disponer de estos datos en el cuestionario clínico de AR del proyecto PSE IMID-Kit.

Antes de comentar los resultados del presente proyecto en concordancia con los resultados del registro británico, debemos señalar que en relación al tratamiento de la AR con FAMES está claramente establecido que la actividad de la enfermedad medida por el índice DAS28 al inicio del tratamiento con FAMES es un factor pronóstico muy importante para alcanzar la remisión. Esta relación será posteriormente comentada en el apartado de biomarcadores de remisión pero hemos considerado citarla aquí de nuevo por el antecedente que supone.

Si observamos la tabla 7 de la página 48, se objetiva que la mayoría de los estudios que evalúan de forma específica la relación existente entre el DAS28 a la semana basal y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  se centran básicamente en los criterios de remisión.

En un estudio publicado por Aletaha et al <sup>(254)</sup> en el año 2007 se observó una correlación positiva entre la actividad de la enfermedad a la semana basal evaluada mediante los índices DAS28, SDAI y CDAI, y la actividad de la enfermedad al año de seguimiento. En este estudio se incluyeron 1.342 pacientes con AR temprana que recibían tratamiento en monoterapia (bien con MTX, ADA o ETA) y pacientes que recibían ADA o ETA en terapia combinada con MTX. También analizaron 712 pacientes con AR avanzada que habían recibido tratamiento con MTX en monoterapia o anti-TNF $\alpha$  combinado con MTX. En este estudio se realizó la valoración de la actividad de la enfermedad a las 4, 8, 12, 24 y 52 semanas. Los resultados de este estudio sugieren que la actividad de la enfermedad objetivada sobre todo a la semana basal y al mes de iniciado el tratamiento está significativamente asociada a la actividad de la enfermedad al año de tratamiento. En cualquier caso la actividad de la enfermedad en todos los periodos de evaluación (incluidas las semanas 12 y 24) se correlacionaba positivamente con la actividad de la enfermedad al año del seguimiento.

Al año siguiente Kristensen et al publicaron un estudio donde se incluyeron 1.565 pacientes con AR que habían recibido tratamiento anti-TNF $\alpha$  y se evaluó la eficacia clínica mediante la respuesta ACR y EULAR, y la remisión medida por el índice DAS28 a los tres meses de tratamiento. En este estudio se objetivó una correlación directa entre la actividad de la enfermedad a la semana basal y la buena respuesta ACR (i.e. ACR50 y ACR70). Sin embargo, se objetivó una relación



inversa con la remisión determinada por los criterios EULAR que comentaremos en el próximo apartado <sup>(246)</sup>.

Si analizamos todos estos datos en su conjunto, solo existen dos estudios que evalúen la asociación entre el índice DAS28 a la semana basal y la respuesta EULAR determinada a las 12 o 24 semanas de seguimiento, el estudio del registro británico y el presente proyecto. En ambos estudios no se identifica a la actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento determinada por el DAS28 como un biomarcador de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Los otros dos estudios comentados, el estudio de Aletaha et al, evalúa la actividad de la enfermedad a la semana basal en relación a la actividad alcanzada al año de seguimiento, y el estudio de Kristensen et al, evalúa la actividad basal en relación a la respuesta ACR50 y ACR70. En consecuencia, en base a nuestro estudio podemos concluir que no existe una relación entre el índice DAS28 a la semana basal y la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento. Sin embargo, esto no implica que la respuesta no este afectada por la actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento. Los criterios de respuesta EULAR contemplan la variación absoluta del DAS28 y la actividad de la enfermedad en el momento de la valoración.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre la actividad de la AR determinada por el índice DAS28 a la semana basal y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

El número de FAMES previos determina otra variable estudiada cuando se analizan biomarcadores clínicos de respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . En nuestro estudio observamos que aquellos pacientes que han recibidos un mayor número de FAMES presentan a las 12 semanas de seguimiento una menor respuesta EULAR, y esta asociación fue estadísticamente significativa. Estos resultados coinciden con los datos reportados en la cohorte británica donde también se observó una asociación entre el número de FAMES previos y la respuesta EULAR al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  determinada a los 6 meses de seguimiento <sup>(231)</sup>. No obstante se debe considerar que en nuestro estudio el número de FAMES previos fue en relación al inicio del estudio tal y como se comentó en el apartado de la metodología y no con respecto al inicio del tratamiento biológico como en la cohorte británica.

*En nuestra serie se ha objetivado una asociación entre el número de FAMES previos a la inclusión en el estudio en pacientes con AR y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

Otras variables analizadas en el presente proyecto como los años de evolución de la enfermedad y la edad al inicio del tratamiento no estuvieron asociadas de forma significativa con la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento. De forma similar a los resultados de este proyecto, en ninguno de los estudios comentados previamente se ha descrito una asociación significativa entre la duración de la enfermedad y la edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  con la respuesta clínica. Únicamente cabe señalar que en el estudio de Hyrich et al <sup>(231)</sup> de la cohorte británica se observó una asociación no significativa entre la buena respuesta EULAR y el grupo de pacientes con una AR menos evolucionadas. Es

este estudio se estableció un criterio de clasificación según la evolución de la AR a partir de un umbral de 5 años de evolución. En relación a los años de evolución de la enfermedad previos al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  debemos tener en consideración que en todos estos estudios previamente comentados y sobre todo en los registros, se han incluido pacientes con AR de larga evolución.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre los años de evolución de la enfermedad y la edad al inicio del tratamiento y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

## 2.4.- Biomarcadores serológicos de respuesta

Los biomarcadores serológicos analizados en el presente proyecto han sido el Factor reumatoide y los anticuerpos anti-CCP. En nuestra cohorte no se ha observado una asociación significativa entre la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  a las 12 semanas de seguimiento y la presencia o ausencia del FR o de los anticuerpos anti-CCP. En el análisis estratificado según los distintos tratamientos se observó que el FR positivo estaba asociado de forma estadísticamente significativa a una peor respuesta pero solo en el grupo de pacientes tratados con IFX. Esta asociación no se observó en los grupos de pacientes tratados con ADA y con ETA. Así mismo, la presencia de anticuerpos anti-CCP presentó una asociación significativa con la respuesta al tratamiento con ADA pero no con los demás fármacos analizados.

Existen diferentes estudios que evalúan la influencia de los autoanticuerpos sobre la respuesta a los fármacos anti-TNF $\alpha$  con resultados realmente contradictorios. En un estudio publicado por Bobbio-Pallavicini et al <sup>(257)</sup> en el que se incluyeron 132 pacientes con AR de larga evolución, tratados con anti-TNF $\alpha$ , no se objetivó una diferencia significativa entre el grupo de pacientes respondedores y no respondedores en relación a la positividad de los anticuerpos anti-CCP y del FR. No obstante en este estudio, los títulos del FR de tipo IgA al inicio del tratamiento estaban elevados de forma significativa en los pacientes no respondedores en comparación con los pacientes respondedores.

Sin embargo, Potter et al <sup>(256)</sup> que incluyeron 642 pacientes tratados con los tres fármacos anti-TNF $\alpha$  más frecuentemente comercializados observaron que los pacientes con FR positivo y anticuerpos anti-CCP positivos presentaban de forma significativa un menor descenso de los valores del DAS28 a los 6 meses de haber iniciado el tratamiento en comparación con los pacientes con FR negativo y anti-CCP negativo. Este análisis se realizó en relación al IFX y al ETA ya que en este estudio el grupo de pacientes tratados con ADA fue excluido por representar un bajo tamaño muestral. Es importante señalar que en este estudio no se había incluido un grupo control para establecer con certeza esta asociación y que la determinación de estos anticuerpos fue realizada en algunos pacientes después del inicio del tratamiento y no a la semana basal. No obstante este estudio coincide parcialmente con nuestros resultados ya que la asociación más robusta se observó con el grupo de pacientes tratados con IFX.

En acuerdo con este estudio, en el subanálisis del registro británico BSRBR que analizaba esta asociación se objetivaron unos resultados similares. Se observó que la presencia de FR y de los anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR tratados con biológicos estaba asociada a una menor respuesta al tratamiento y que la utilización de MTX en forma concomitante con ETA estaba asociado a una mejor respuesta.

Recientemente se ha publicado otro artículo que incluye una muestra de 450 pacientes tratados con anti-TNF $\alpha$  (IFX, ETA i ADA) que observó que la presencia de anticuerpos anti-citrulinados estaba asociada a una peor respuesta a los 6 meses de iniciado el tratamiento sin hacer distinción según el fármaco anti-TNF $\alpha$  <sup>(258)</sup>. Tal y como se ha comentado en la introducción este estudio aporta datos interesantes en relación al tipo de péptido citrulinado evaluado. A pesar de que estos autores concluyen que existe una asociación negativa entre la presencia de anticuerpos anti-CCP y la respuesta, esta puede estar restringida a anticuerpos dirigidos contra determinados péptidos citrulinados. Observaron que los anticuerpos anti-cFib como los anticuerpos anti-CCP estaban asociados a una pobre respuesta. En contraste, los anticuerpos CEP-1 y cVim, los cuales se ha demostrado que están fuertemente asociados con el epítotope compartido, no estuvieron asociados con la respuesta.

A diferencia de los estudios comentados previamente cabe destacar el estudio publicado por Klassen et al, en el año 2011, en el que se objetiva una asociación posible entre la presencia de FR y de anticuerpos anti-CCP. De tal forma que la presencia de FR y de anticuerpos anti-CCP condicionan una mejor respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. Este estudio se realizó en pacientes que recibieron solo tratamiento con IFX y en un reducido número de pacientes (n=101). Se evaluó la respuesta a las 16 semanas de tratamiento, un periodo de tiempo relativamente más corto que en los otros estudios que objetivan una asociación negativa y similar a la del presente proyecto donde no objetivamos ninguna asociación.

Los datos publicados hasta la actualidad son contradictorios y difieren sustancialmente en el periodo en el que se determina la repuesta, la asociación variable según el fármaco anti-TNF $\alpha$  y la hipótesis de una asociación restringida solo a determinados péptidos citrulinados. Deben realizarse más estudios para determinar si la presencia o ausencia del FR y anticuerpos anti-CCP determina la respuesta a largo plazo, hecho que sería de gran importancia en la práctica clínica, y si su asociación puede estar también determinada por el tipo de anti-TNF $\alpha$ , sobre todo en relación a la existencia de una posible asociación con la estructura molecular del fármaco. En este sentido existen resultados muy preliminares en el *Grup de Recerca de Reumatologia* en los que se objetiva que la respuesta y el estatus de positividad para estos anticuerpos podría estar condicionada por la estructura molecular del anti-TNF $\alpha$  (i.e. anticuerpo monoclonal vs receptor soluble). Estos datos quizás podrían explicar los resultados obtenidos en el presente proyecto y en el estudio publicado por Potter et al.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre la presencia o ausencia del FR y de los anticuerpos anti-CCP en los pacientes con AR y la respuesta EULAR al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

### **3.- Biomarcadores no genéticos de remisión al tratamiento anti-TNF $\alpha$**

Tal y como se ha comentado previamente en distintos apartados de este documento y está aceptado ampliamente en la literatura, el objetivo terapéutico en la artritis reumatoide ha cambiado sustancialmente en los últimos años. Esta evolución queda reflejada tanto en los ensayos clínicos, como en los consensos de las distintas sociedades científicas y como en la práctica clínica diaria. Al inicio del desarrollo de los tratamientos biológicos los distintos ensayos clínicos tenían como objetivo primario alcanzar una respuesta ACR20<sup>(162,167,169)</sup>. Actualmente este grado de respuesta ya se considera insuficiente y los ensayos clínicos más recientes están diseñados para alcanzar respuestas ACR50, ACR70 o incluso la remisión (i.e. ACR 90 o remisión EULAR)<sup>(175,179)</sup>. Los últimos consensos sobre la indicación de terapia biológica ya constatan que el objetivo fundamental en el tratamiento de la AR es alcanzar la remisión o un grado mínimo de actividad, lo que se denomina como LDA (*Low Disease Activity*)<sup>(119, 363, 364)</sup>. En la práctica clínica este objetivo es una realidad ciertamente posible si se utilizan las estrategias de tratamiento más adecuadas para cada paciente y se realiza un control estricto de la actividad de la enfermedad mediante el uso continuo de medidas de desenlace y la atención al paciente por parte de facultativos altamente especializados y personal sanitario de apoyo entrenado. Por tanto en este contexto ampliamente consensuado uno de los retos más importantes en investigación biomédica, ya no es solo encontrar biomarcadores asociados a la respuesta clínica sino analizar si estos biomarcadores también son válidos para predecir la remisión o en su defecto identificar biomarcadores específicos de remisión.

En base a esta necesidad clínica prioritaria se ha realizado un subanálisis para identificar biomarcadores no genéticos de remisión y evaluar su posible superposición con los biomarcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. En nuestra serie 127 pacientes que representan un 20% de todos los sujetos a estudio han alcanzado la remisión a las 12 semanas de tratamiento. El porcentaje de pacientes que alcanzan la remisión es el esperado, tal y como comentaremos posteriormente, y suficiente para realizar un subanálisis que nos permita identificar biomarcadores clínicos de remisión. Sin embargo no se ha podido realizar el subanálisis para identificar biomarcadores genéticos de remisión debido a la falta de poder estadístico como resultado de un pequeño tamaño muestral.

El concepto de remisión a pesar de que es un objetivo terapéutico alcanzable está sometido a la contradicción de su definición. Desde el punto de vista clínico se utiliza el término remisión como sinónimo de remisión clínica y en este contexto es tal y como se ha utilizado en el presente proyecto. Sin embargo está ampliamente aceptado que remisión clínica no es sinónimo de remisión biológica y que un porcentaje elevado de pacientes que se considera que están en remisión clínica la enfermedad progresa lentamente<sup>(222)</sup> y la inflamación subclínica puede llevar a

una mayor destrucción articular y una mayor discapacidad funcional. Además se conoce que un 50 aproximadamente de los pacientes que están en remisión presentan una reactivación de la enfermedad dentro de los siguientes 6 o 12 meses<sup>(251)</sup>. La utilización de técnicas de imagen como la Ecografía EcoDopler y la Resonancia Magnética Nuclear, constituyen herramientas importantes para aportar datos objetivos de actividad en los pacientes en remisión clínica y se está trabajando en distintas líneas de investigación para definir los criterios de remisión medidos por Ecografía y Resonancia. Aunque el uso de estas técnicas va a ser fundamental para delimitar el concepto de remisión clínica, su utilización en la práctica clínica diaria está limitada por su disponibilidad y elevado coste. Además en un estudio a gran escala como el del presente proyecto en el que participan un elevado número de investigadores, la utilización de técnicas de imagen y la medición de la actividad de la enfermedad queda actualmente limitado por sí mismo. Por tanto en este proyecto, hemos utilizado un criterio clínico para definir la remisión y el más utilizado en los distintos ensayos clínicos, registros y práctica clínica, un valor de DAS28 < 2,6.

Un valor de DAS28 < 2,6 es un criterio de remisión ampliamente utilizado tal y como acabamos de comentar. Sin embargo y de forma muy reciente su utilización se ha visto controvertida, sobre todo por estar muy influenciado por el valor de los reactantes de fase aguda (i.e. VSG y PCR). El desarrollo de terapias biológicas que tienen un efecto directo sobre la PCR como por ejemplo el tocilizumab<sup>(207,208)</sup> ha puesto de manifiesto esta limitación del DAS28 en la valoración de la remisión y por tanto de la respuesta clínica.

Muy recientemente un grupo de expertos EULAR/ACR ha desarrollado unos nuevos criterios de remisión en pacientes con artritis reumatoide<sup>(222)</sup>, tal y como se describe en la introducción. No obstante estos criterios son mucho más estrictos que los que habitualmente se han utilizado en la práctica clínica diaria.

Kuriya et al<sup>(380)</sup> analizó la remisión en un grupo de pacientes con AR de reciente comienzo basándose en 8 definiciones e incluyendo la recientemente propuesta por el EULAR/ACR. En los 369 pacientes incluidos en el estudio, se valoró la remisión a los 12 meses de tratamiento tanto en el grupo que había recibido FAMES tradicionales como en el grupo que había recibido terapias biológicas. En este estudio se observó que un 18% de los pacientes alcanzaba la remisión utilizando los nuevos criterios EULAR/ACR. Sin embargo utilizando el valor del índice DAS28 < 2,6 el 40 % de los pacientes alcanzó la remisión.

Un segundo estudio en el que se incluyó un elevado número de pacientes con AR (n=1.083) y tratamiento con terapia biológica, se observó que un 16% de los pacientes alcanzaba la remisión al año del inicio del tratamiento utilizando el criterio del índice del DAS28 y el 13% de los pacientes alcanzaba la remisión utilizando los nuevos criterios de remisión propuestos por el EULAR/ACR. Esta diferencia entre ambos estudios puede deberse a que en el primer estudio se incluyeron pacientes con AR de reciente comienzo y en el segundo pacientes con AR más evolucionadas. En este sentido tal y como se ha descrito previamente, en el presente proyecto se han incluido pacientes con AR de más de 2 años de evolución

con un valor medio de los años de evolución de la enfermedad de  $9,4 \pm 7,8$  años. Por tanto, en base a los resultados de este último estudio podemos considerar que el impacto que pueda tener el haber utilizado el índice DAS28 para la selección de los pacientes que estaban en remisión va a ser mínimo. En cualquier caso el índice DAS28 para evaluar remisión ha sido el más utilizado hasta ahora y nos va a permitir comparar con los resultados de otros estudios o registros. Desconocemos la aplicabilidad de los nuevos criterios EULAR/ACR a largo plazo.

En nuestra muestra de 628 pacientes con AR de más de dos años de evolución, se observó que el 20 % de los pacientes había alcanzado la remisión a los tres meses de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Este porcentaje es claramente superior al observado en el registro de la cohorte británica<sup>(231)</sup> donde se utilizó el mismo criterio (i.e. DAS28 < 2,6) para definir la remisión a las 24 semanas de iniciado el tratamiento con IFX y ETA. En este registro se observó un porcentaje de remisión del 9%. Los comentarios realizados en relación a la respuesta son aquí también aplicables en relación a la comparación de ambos registros. El menor porcentaje de remisión puede ser debido a que en el registro británico se incluyen pacientes con AR más avanzadas que los pacientes con AR incluidos en nuestro estudio (9 vs 14 años) y sobre todo a la indicación más tardía del tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la población inglesa. Las diferencias en el periodo en el que se determina la remisión y un DAS28 basal más elevado también explican parte de las diferencias en el porcentaje de remisión alcanzado entre ambos estudios.

Sin embargo nuestros resultados coinciden con el estudio de Burmester et al<sup>(229)</sup> que analizaron una población de 6.051 pacientes con AR tratados con ADA y analizaron la remisión utilizando varios criterios entre ellos el criterio del DAS28 < 2,6 a las 12 semanas de iniciado el tratamiento. En este estudio al igual que en el nuestro, el 20 % de los pacientes alcanzaron la remisión a las 12 semanas de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . No obstante ambos estudios difieren en el tratamiento analizado ya que el estudio de Burmester et al<sup>(229)</sup> solo se incluyeron pacientes tratados con ADA.

En un segundo estudio publicado por Mancarella et al<sup>(232)</sup> se incluyeron 597 pacientes tratados con los tres anti-TNF $\alpha$  más comercializados (IFX, ETA y ADA) y observaron que un 25 % de los pacientes alcanzaron un índice DAS28 < 2,6 a las 24 semanas de tratamiento. Estos resultados coinciden con el estudio de la cohorte DANBIO<sup>(361)</sup> que incluyó 1.839 pacientes con AR tratados con los mismos anti-TNF $\alpha$  y en donde se observó una remisión determinada por el criterio del DAS28 a los 6 meses de tratamiento del 26 % de los pacientes. En ambos estudios la mayoría de los pacientes eran AR avanzadas pero con un valor de la media del tiempo de evolución de la enfermedad menor que los pacientes con AR de la cohorte británica, lo que podría explicar en gran parte las diferencias observadas con los otros estudios.

En la actualidad tampoco existen estudios *head-to-head* que evalúen la eficacia de los distintos tratamientos anti-TNF $\alpha$  para alcanzar la remisión. No obstante existen registros anteriormente comentados como el registro DANBIO en el que se observó que los pacientes tratados con ADA alcanzaban con mayor frecuencia

la remisión a los 6 meses de iniciado el tratamiento, mientras que los pacientes tratados con IFX alcanzaron una menor tasa de remisión en relación a los demás tratamientos<sup>(361)</sup>.

Sin embargo en el estudio de la cohorte italiana<sup>(360)</sup> que incluyó 1.005 pacientes con AR establecida (228 tratados con ETA, 282 tratados con ADA y 495 tratados con IFX) se observó que el 29,9% de los pacientes alcanzan la remisión valorada por el índice DAS28<2,6 después de 14,57 meses de seguimiento. En este estudio no se objetivaron diferencias significativas en el porcentaje de remisión alcanzado en cada uno de los tres fármacos anti-TNF $\alpha$ . De forma interesante en este estudio no se observó ninguna asociación entre el porcentaje de remisión y los años de evolución de la enfermedad.

Coincidiendo con estos resultados, en nuestro estudio se ha observado que el tratamiento con IFX estaba asociado de forma estadísticamente significativa con un mayor porcentaje de pacientes que no alcanzaban la remisión a las 12 semanas de tratamiento (OR= 2,89) y que el tratamiento con ETA estaba asociado de forma significativa con un mayor porcentaje de pacientes que alcanzaban la remisión (OR= 0,53).

### 3.1.- Biomarcadores epidemiológicos de remisión

El número de estudios publicados hasta la actualidad diseñados específicamente para observar datos de remisión en pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$  es muy reducido<sup>(229, 232, 360)</sup> y en muchas ocasiones estos datos se obtienen de estudios que evalúan al repuesta ACR20, ACR50 o respuesta EULAR como objetivo primario, con las limitaciones que ellos comporta.

Tal y como se observa en la tabla 3 de la introducción (página 44) existen varios estudios<sup>(231, 232, 229)</sup> en los que se contempla evaluar la relación entre el género de los pacientes y la remisión al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . En los estudios de Hyrich, Mancarella y Burmester, se observó que el género masculino es un biomarcador asociado a la remisión en pacientes con AR y que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Forslind et al<sup>(381)</sup> incluyeron 698 pacientes con AR de reciente comienzo ( $\leq 1$  año) que habían recibido tratamiento con FAMES convencionales al inicio del estudio y posteriormente en algunos pacientes se asoció a la terapia biológica. En este estudio se utilizó como parámetro de valoración de la remisión el índice DAS28 a los 18, 24 y 60 meses y observaron que el género masculino era el predictor más robusto de remisión en pacientes con AR de reciente comienzo independientemente del valor del DAS28 a la semana basal. En el presente proyecto hemos observado una débil asociación ( $P=4,4E-02$ ) entre el género masculino y la remisión, pero solo en el análisis univariante, ya que al realizar el análisis multivariante esta asociación desapareció. Estos resultados pueden explicarse porque en nuestra muestra el grupo de pacientes de género masculino presentó un DAS28 a la semana basal inferior de forma significativa en comparación con el de los pacientes de género femenino (datos no presentados en el presente proyecto). Teniendo en cuenta los datos publicados y comentados previamente, no podemos

descartar que no exista una asociación entre el género masculino y la remisión, y que esta asociación no este influenciada por la actividad de la enfermedad medida por el DAS28 a la semana basal.

*En nuestra serie se ha objetivado una asociación entre el género masculino en los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28<2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

En relación al resto de los biomarcadores epidemiológicos analizados en el presente proyecto de tesis doctoral no se han objetivado diferencias significativas entre el nivel de estudios, el habito tabáquico y el consumo de alcohol y la remisión determinada por el índice DAS28 a las 12 semanas de haber iniciado un tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

Al igual que los resultados obtenidos al analizar el nivel de estudios en relación con la repuesta a los distintos tratamientos anti-TNF $\alpha$  se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la remisión y el grupo de pacientes tratados con ADA. En este grupo se observó que a mayor nivel educativo existía una mayor probabilidad de alcanzar la remisión lo que nos sugiere de nuevo que el nivel de estudios debe ser realmente considerado cuando se indica un tratamiento. Tras una exhaustiva revisión de la literatura este es el primer estudio que valora la relación existente entre el nivel de estudios y la respuesta, incluida la remisión, al tratamiento anti-TNF $\alpha$  por lo que sería muy interesante llevar acabo más estudios para poder confirmar esta asociación.

*En nuestra serie se ha objetivado una asociación entre el nivel de estudios de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28<2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

En relación al consumo de alcohol se observó que los pacientes tratados con IFX que consumen alcohol tienen una mayor probabilidad de alcanzar la remisión (OR=0,19). Sin embargo en el grupo de pacientes tratados con ETA el consumo de alcohol parece disminuir la probabilidad de alcanzar la remisión (OR=2,05) aunque esta asociación desapareció al incluir en el análisis otras variables. Hasta la fecha no hemos encontrado ningún otro estudio que valore la asociación entre el consumo de alcohol y la respuesta a estos tratamientos o incluso la remisión, a pesar del elevado consumo de alcohol en la sociedad y que alcanza en nuestra serie un 73 % de los pacientes con AR que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre el consumo de alcohol de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28< 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

De forma similar al consumo de alcohol, no hemos objetivado en nuestra serie de pacientes una asociación estadísticamente significativa entre la remisión al tratamiento anti-TNF $\alpha$  y el habito tabáquico. La asociación significativa observada entre el hábito tabáquico y la remisión en el análisis univariante desaparece en el análisis mutivariante al incluir en el análisis el género y el estatus de anticuerpos



anti-CCP. En el sub-análisis comentado en el apartado de resultados tampoco se observó una asociación al considerar solo a los pacientes fumadores activos vs los pacientes no fumadores. Estos datos coinciden con el estudio realizado por Burmester et al <sup>(229)</sup> en el que tampoco se observó una asociación con el hábito tabáquico y la remisión. No obstante en este estudio, tal y como se ha comentado, solo se incluyeron pacientes tratados con ADA y no se incluyeron pacientes tratados con ETA e IFX. Precisamente los escasos estudios realizados en los cuales el tabaquismo ha sido estudiado más ampliamente como un factor asociado a una peor respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  incluyen sobre todo pacientes tratados con IFX y ETA. En el estudio publicado por Saevarsdottir et al <sup>(245)</sup>, se analizó la respuesta EULAR y la remisión según el criterio del DAS28 < 2,6 en una cohorte de 535 pacientes tratados con anti-TNF $\alpha$  y al igual que en nuestro estudio evaluaron la respuesta a las 12 semanas de tratamiento. En este estudio se observaron unos resultados paralelos a los obtenidos en relación con la respuesta EULAR. Los pacientes fumadores activos en el momento del diagnóstico tienen una menor probabilidad de alcanzar la remisión que los pacientes exfumadores y los pacientes no fumadores.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre el hábito tabáquico de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28 < 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

### 3.2.- Biomarcadores clínicos de remisión

En relación a los biomarcadores clínicos de remisión en pacientes con AR que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$  únicamente se ha objetivado una asociación significativa con la actividad de la enfermedad determinada por el índice DAS28 a la semana basal. Además esta asociación se confirma para cada uno de los tratamientos anti-TNF $\alpha$ : IFX, ETA y ADA.

En nuestra población de pacientes se ha observado de forma robusta que a menor valor del DAS28 al inicio del tratamiento existe una mayor probabilidad de alcanzar la remisión a las 12 semanas de seguimiento, y esta asociación fue estadísticamente significativa en los tres grupos de tratamiento anti-TNF $\alpha$  analizados. El valor de la media del DAS28 en los pacientes que alcanzaron o no la remisión fue de  $5,71 \pm 1,1$  y  $4,83 \pm 1$ , respectivamente. Prácticamente para una diferencia en un punto en el valor de la media del DAS28 a la semana basal se determina esta marcada diferencia en el porcentaje de pacientes que alcanzan la remisión. La diferencia de asociación se mantiene significativa en el análisis multivariante.

Los resultados de nuestro estudio están en consonancia con la mayoría de los datos publicados en lo que respecta a la remisión, a pesar de lo que hemos comentado previamente en relación a la respuesta EULAR sobre la que se han publicado resultados más dispares.

En un estudio publicado en el año 2007 que incluyó 881 con AR y terapia biológica (IFX, ETA, ADA y ANK) y 265 con terapia con un FAME convencional, todos procedentes del registro alemán RABBIT (*German acronym for Rheumatoid Arthritis–Observation of Biologic Therapy*), se observó que los pacientes que recibían tratamiento con terapias biológicas tenían el doble de probabilidad de alcanzar la remisión en comparación con los pacientes que fueron tratados con FAMES convencionales. Entre los pacientes que alcanzaron la remisión se observó que un valor bajo en el DAS28 a la semana basal y una puntuación en el HAQ < 1,75 eran claros predictores de respuesta al tratamiento <sup>(251)</sup>.

Aletaha et al <sup>(254)</sup> anteriormente comentado, observaron que aquellos pacientes que presentaban una actividad moderada o baja de la enfermedad a la semana basal tenían una mayor probabilidad de alcanzar la remisión de la enfermedad a los 12 meses de iniciado el tratamiento en comparación con aquellos pacientes que iniciaban el tratamiento con una actividad elevada de la enfermedad. Además se observó que aquellos pacientes que alcanzaron la remisión al año de seguimiento eran aquellos pacientes ya habían alcanzado bajos valores del índice SDAI a los tres meses de tratamiento. Estos datos sugieren que la respuesta alcanzada a los 3 meses de iniciado el tratamiento se correlaciona de forma positiva con la actividad de la enfermedad al año de tratamiento. Al igual que en nuestro estudio, estos resultados también se confirmaron con los diferentes esquemas terapéuticos analizados (MTX y anti-TNF $\alpha$  ambos en monoterapia y anti-TNF $\alpha$  en combinación con MTX).

De nuevo estos resultados coinciden con otros estudios, como el estudio publicado por Keystone et al <sup>(251)</sup> que incluyeron pacientes procedentes del estudio TEMPO (n=677) tratados con MTX y ETA en monoterapia y ETA combinado con MTX (n=167) y del estudio ERA (n=414) tratados con MTX y ETA en monoterapia (381) y observaron que los pacientes con una actividad moderada alcanzaron con mayor frecuencia la remisión o una actividad más baja valorada por el índice de DAS28 al año de tratamiento con MTX y/o ETA en comparación con los pacientes con una actividad más elevada de la enfermedad al inicio del tratamiento.

Contrariamente a estos resultados cabe citar el estudio realizado en la cohorte italiana publicado por Atzeni et al <sup>(360)</sup> donde no se observó ninguna asociación entre los valores del índice DAS28 a la semana basal y la remisión a los 6 meses de tratamiento con los tres anti-TNF $\alpha$ . No obstante en este estudio investigaron el rol de cada uno de los componentes del índice de forma individual y observaron que una VSG elevada y un recuento elevado de articulaciones dolorosas estaba asociado con una menor remisión.

*En nuestra serie se ha objetivado una asociación entre el DAS28 a la semana basal de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28 < 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

En nuestro estudio, la edad al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  no estaba asociada con la remisión a las 12 semanas de seguimiento. Esto difiere de los resultados del estudio publicado por Burmester et al <sup>(229)</sup> que observó que la edad al inicio

del tratamiento anti-TNF $\alpha$  estaba asociada de forma significativa con la remisión. En este estudio que incluyó 6.051 pacientes tratados con ADA se observó que los pacientes menores de 52 años tenían mayor probabilidad de alcanzar la remisión a las 12 semanas en comparación con los pacientes mayores de esa edad. Estos resultados coinciden con los resultados publicados por de Mancarella et al <sup>(232)</sup> donde observaron que los pacientes más jóvenes alcanzaban la remisión a los 6 meses del tratamiento anti-TNF $\alpha$  con mayor frecuencia que los pacientes de mayor edad.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre la edad al inicio del tratamiento de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28 < 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

El número de FAMES previos fue otra variable analizada en nuestro estudio que presentó una asociación inversa con la remisión pero solo entre los pacientes tratados con ADA, coincidiendo con los resultados de otros estudios en donde esta variable fue identificada como un biomarcador negativo de remisión <sup>(231,251)</sup>.

En el análisis global independiente por fármaco no se objetivó ninguna asociación entre el número de FAMES previos y la presencia de remisión a los tres meses de tratamiento.

Cabe destacar que uno de estos estudios a los que hacemos referencia es el estudio del registro británico <sup>(231)</sup> donde se observó una relación inversa a partir de una muestra de 292 pacientes en remisión pero que solo había recibido tratamiento con IFX o ETA. El estudio que únicamente valora pacientes tratados con ADA y en base a nuestros datos es de especial interés, es el estudio publicado por Burmester et al <sup>(229)</sup>. En este estudio se incluyeron 6.610 pacientes con AR que recibieron tratamiento con ADA y a partir de una muestra de 1.187 pacientes que alcanzaron la remisión a las 12 semanas no se objetivó una asociación entre el número de FAMES previos y la remisión.

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre el número de FAMES previos de los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28 < 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

### **3.3.- Biomarcadores serológicos de remisión**

De forma similar se ha observado en el análisis de los biomarcadores serológicos de respuesta EULAR, cuando analizamos los biomarcadores serológicos de remisión no hemos observado ninguna asociación significativa entre la presencia del FR y los anticuerpos anti-CCP y la remisión a las 12 semanas de tratamiento. Sin embargo al igual como ocurre con los resultados publicados en relación a la asociación de los anticuerpos y la respuesta EULAR, la relación entre la presencia del FR y los anticuerpos anti-CCP y la remisión no está bien establecida.

En el estudio publicado por Mancarella et al <sup>(232)</sup> se incluyeron un total de 1.257 pacientes con AR que iniciaron el tratamiento con anti-TNF $\alpha$  y se objetivó remisión clínica en el 24% de los pacientes con FR positivo y en el 36% de los pacientes con FR negativo. La asociación negativa entre el FR y la remisión, aunque débil, fue estadísticamente significativa ( $P=3E-02$ ).

Sin embargo, los resultados de nuestro estudio coinciden con los de otros estudios, como el publicado por Burmester et al <sup>(229)</sup> que analizó la remisión en 6.610 pacientes con AR y tratamiento con ADA, de los cuales 1.257 alcanzaron la remisión a las 12 semanas. En este estudio tampoco observaron una asociación estadísticamente significativa entre el estatus de FR y la remisión. En este estudio no se evaluó la relación entre los anticuerpos anti-CCP y la remisión. Así mismo, los resultados de Burmester y los del presente proyecto coinciden con los resultados del estudio de la cohorte británica <sup>(231)</sup> que incluyó 2.879 pacientes y que valoraron la remisión a los 6 meses del tratamiento con ETA y con IFX. En este estudio tampoco se observó una asociación significativa entre la presencia del FR y la remisión. Los resultados publicados por Atzeni et al <sup>(360)</sup> en relación a la cohorte italiana también objetivan unos resultados similares. En esta cohorte se incluyeron 1.005 pacientes con AR y se evaluó la remisión utilizando el criterio del DAS28 <2,6 y se observó que la presencia del FR positivo y de los anticuerpos anti-CCP positivos no estaban asociados con la remisión al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

*En nuestra serie no se ha objetivado una asociación entre el FR y los anticuerpos anti-CCP en los pacientes con AR y la remisión clínica determinada por un índice DAS28 < 2,6 al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$ .*

## 4.- Biomarcadores genéticos de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

### 4.1.- Característica de los sujetos del estudio

La muestra incluida para el análisis de asociación del genoma completo es una muestra representativa de toda la cohorte de 628 pacientes, con características similares, no encontrándose diferencias significativas entre las características epidemiológicas, clínicas y serológicas entre ambas cohorte (datos no presentados en este estudio).

La población incluida en nuestro estudio de GWAS presenta algunas diferencias importantes a considerar, en relación a las características epidemiológicas, clínicas y serológicas con respecto a la población incluida en los otros estudios GWAS anteriormente publicados, tal y como se observa en la tabla 48.

**Tabla 48.** Características de los pacientes incluidos en los GWAS en relación a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Variables		Proyecto de tesis	Liu et al	Plant et al	Krintel et al
<b>Género</b>	Femenino	82%	75%	78%	80%
<b>Tabaco</b>	Fumador	25%	15%	17%	33%
	Exfumador	18%	-	26%	
	No Fumador	57%	-	57%	
<b>FR</b>	+	78%	84%	-	63%
<b>anti-CCP</b>	+	78%	62%	-	59%
<b>Edad al inicio del tratamiento anti-TNF<math>\alpha</math></b>		53,35 $\pm$ 11,8	57 $\pm$ 13,5	58 $\pm$ 11,0	55 $\pm$ 14,0
<b>Años de evolución de la enfermedad</b>		10,24 $\pm$ 8,2	8 $\pm$ 8,0	14 $\pm$ 10	11 $\pm$ 11,0
<b>DAS28 (SB)</b>		5,57 $\pm$ 1,1	5,2 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 0,9	4,9 $\pm$ 1,2

En estos cuatro estudios GWAS, el género que predomina es el femenino (entre 75 y 82 % de los pacientes). Nuestro estudio es el único estudio que analiza variables epidemiológicas tales como el nivel de estudios y el consumo de alcohol por lo que no podemos comparar las frecuencias observadas en el presente proyecto.

En nuestro estudio hemos estratificado la muestra en relación al hábito tabáquico de forma similar al estudio de Plant et al<sup>(325)</sup>, y a diferencia de los estudios de Liu et al<sup>(324)</sup> y Krintel et al<sup>(270)</sup> hemos considerado el estatus de exfumador. Con respecto a la frecuencia observada de pacientes fumadores activos, se observó una mayor frecuencia en nuestro estudio y en el estudio de Krintel et al (25% y 33% de los

pacientes, respectivamente) en comparación con los estudios de Liu et al y Plant et al (15% y 17% de los pacientes, respectivamente).

La frecuencia de pacientes con FR positivo en nuestra muestra (78 % de los pacientes) y anti-CCP positivo (78 % de los pacientes) es similar a la observada en los otros estudios GWAS, a excepción del estudio de Plant et al, en el que no disponemos de estos datos.

Al igual que en el estudio de Liu et al y de Krintel et al los pacientes incluidos en nuestro estudio eran pacientes *naïve* a terapias biológicas. Sin embargo en el estudio de Plant et al incluyeron 26 pacientes (5%) con el antecedente de haber recibido tratamiento anti-TNF $\alpha$  previamente. En nuestro estudio además se observó una mayor frecuencia de pacientes tratados con ETA y una menor frecuencia de pacientes tratados con IFX y con ADA (ETA (n=133 (37%)), IFX (n=132 (36%)), ADA (n=96 (27%)) coincidiendo con el estudio de Liu et al (ETA (n=39 (44%)), IFX (n=32 (36%)), ADA (n=18 (20%)). A diferencia de nuestro estudio y del estudio de Liu et al, el estudio de Plant et al, incluía pacientes tratados con mayor frecuencia con IFX (n=260 (46%)) y con menor frecuencia con ETA (n=244 (43%)) y con ADA (n=62 (11%)). En el estudio de Krintel et al, al igual que en el estudio de Plant et al incluyeron pacientes con mayor frecuencia tratados con IFX (142 (72%)) y en menor frecuencia con ADA (n=42 (22%)) y a diferencia de todos los demás GWAS incluyendo el nuestro, un porcentaje inferior de pacientes tratados con ETA (n=12 (6%)).

La diferencia más llamativa entre los cuatro GWAS es la observada en relación a los años de evolución de la enfermedad y el valor del DAS28 al inicio del tratamiento. En el estudio de Plant et al los valores de la media del DAS28 a la semana basal fueron más elevados posiblemente debido a las estrictas recomendaciones de la guía británica comentadas anteriormente. Por otra parte en nuestro estudio hemos incluido pacientes de menor edad que los pacientes incluidos en los otros estudios GWAS (53,35  $\pm$  11,8 años).

## 4.2.- Estudio de Asociación de Genoma Completo

### 4.2.1.- Diseño del estudio

El diseño de los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Study*, GWAS) orientados a la identificación de variantes genéticas asociadas a fenotipos complejos, como por ejemplo la respuesta a tratamientos, debe tener en cuenta varios aspectos.

Un primer aspecto fundamental es la capacidad de cribado de la variabilidad del genoma (*genome coverage* en inglés) de la plataforma de genotipado. Es importante recordar que los estudios GWAS explotan la propiedad del desequilibrio de ligamiento para detectar de forma directa o indirecta la asociación con el fenotipo de interés. Por tanto, determinados aspectos como la densidad de los marcadores pero, sobre todo, la ubicación de estos marcadores van a ser

fundamentales. En el momento de la decisión sobre la plataforma de genotipado para el presente GWAS, las principales plataformas disponibles en el mercado eran el *microarray BeadChip Quad610 de Illumina* y el *microarray GeneChip Affy6.0 de Affymetrix*. La primera plataforma, fue diseñada teniendo en cuenta una selección más eficiente de los SNPs, explotando la información sobre el desequilibrio de ligamiento generada por el proyecto internacional *HapMap*. De esta forma, aunque el *BeadChip de Illumina* tenía prácticamente la mitad de sondas que la tecnología de *Affymetrix* (550.000 vs 1.000.000) su capacidad de cribado era muy similar. De hecho, determinados estudios sobre el rendimiento económico acabarían demostrando que, para un mismo presupuesto, el rendimiento del *Quad610* era superior al rendimiento del *Affy 6.0*. (<http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000477>).

Una vez seleccionada la plataforma óptima de genotipado, el otro aspecto crucial de un estudio GWAS es el tamaño muestral. Aunque este aspecto es importante en cualquier análisis estadístico, en los estudios genómicos, donde el número de variables analizadas es muy superior al número de muestras analizadas, la generación de falsos positivos es una limitación muy importante. La principal estrategia para reducir estos falsos positivos es el aumento en el número de muestras analizadas aunque en muchas ocasiones, el coste económico o la enorme dificultad de obtener las muestras impide mejorar el diseño. El tamaño muestral necesario depende directamente de las características de la asociación genética que se pretende detectar. Cuanto menor sea el efecto genético que se espera identificar (i.e. Odds Ratio asociado a la no respuesta a anti-TNF $\alpha$ ), mayor es el tamaño muestral requerido para detectarlo.

Otros aspectos también relevantes sobre la capacidad de identificar nuevos loci de riesgo son el modelo genético subyacente (i.e. Aditivo, Multiplicativo, Dominante o Recesivo), la prevalencia del rasgo fenotípico dentro de la población y la frecuencia del alelo de riesgo. Resulta evidente, sin embargo, que cuando se analiza por primera vez un rasgo complejo como la respuesta a un tratamiento, es imposible tener una estimación precisa de estos parámetros. Generalmente, en estos casos se lleva a cabo una estimación del mínimo efecto genético que se puede detectar con un poder suficiente (i.e. 80%). En el diseño del presente proyecto, asumiendo parámetros no extremos (MAF= 0,2, prevalencia (no respuesta) = 30%,  $\alpha = 5E-08$ , modelo genético multiplicativo), con el tamaño del presente GWAS tenemos >80% de poder para detectar loci con un OR  $\geq 2.2$ . Por tanto, nuestro tamaño muestral puede identificar efectos genéticos moderados. En comparación, el diseño de Krintel et al tendría un 15% de poder para detectar loci con un OR= 2,2 y el diseño de Liu et al no llegaría a penas al 1% de poder para este efecto genético. En diseño de Plant et al tendría un poder superior (>95%). No obstante, aspectos como la menor (~30%) capacidad de cribado de la plataforma seleccionada (*GeneChip Affy 500k*) sería una clara desventaja del estudio realizado en la población inglesa respecto a nuestro estudio.

Finalmente, otro aspecto que en ocasiones no se valora lo suficiente dentro del diseño de los estudios GWAS es la definición del fenotipo a estudio. En rasgos heterogéneos, la disponibilidad de cohortes bien definidas clínicamente y homo-

géneas es un aspecto que permite aumentar sustancialmente el poder de identificar nuevas asociaciones genotipo-fenotipo. En el presente estudio todos los pacientes con AR han sido seleccionados bajo unos mismos criterios en todos los centros participantes. A su vez, la distribución de todos los centros participantes en el estudio es altamente homogénea y representativa de la población española (i.e. población caucásica del sur de Europa). En el próximo apartado de la discusión se han discutido ampliamente las características de nuestra cohorte.

Teniendo en cuenta todos los factores mencionados, el GWAS llevado a cabo en el presente proyecto de tesis doctoral se caracteriza por un diseño óptimo para la identificación de nuevos *loci* asociados a la respuesta terapia anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide.

#### 4.2.2.- *Loci* asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

Los estudios de asociación de genoma completo (i.e. GWAS) son estudios enfocados a analizar las variaciones genéticas asociadas a un determinado fenotipo. Este fenotipo puede hacer referencia a una enfermedad en su conjunto o a determinados subtipos clínicos de la misma. En este sentido es posible estratificar a los pacientes en base a determinadas variables de interés, clínicas<sup>(235)</sup>, serológicas<sup>(256)</sup>, pronósticas<sup>(247)</sup> o de respuesta a tratamiento<sup>(231)</sup>, entre otras. En los últimos 5 años esta estrategia de estudio ha permitido identificar asociaciones significativas entre numerosos *loci* a través del genoma y la mayoría de las enfermedades complejas más prevalentes<sup>(321)</sup>. El resultado de estos estudios ha aumentado nuestro conocimiento sobre las bases biológicas de muchas de estas enfermedades y ha permitido identificar posibles dianas terapéuticas que con un mecanismo de acción más dirigido pueden mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes<sup>(293)</sup>.

En el presente proyecto se ha llevado a cabo un estudio de GWAS en 361 pacientes de origen español genéticamente homogéneos, con el diagnóstico de artritis reumatoide bien caracterizado, en quienes se inició el tratamiento con anti-TNF $\alpha$  tras fallo a fármacos modificadores de la enfermedad. Este proyecto representa el primer estudio de asociación de genoma completo realizado en la población española diseñado con el objetivo de identificar predictores genéticos de respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide. Hasta la fecha se han publicado únicamente tres estudios de GWAS con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la AR, todos en pacientes de origen caucásico pero en diferentes poblaciones, americana, británica y danesa. Nuestra cohorte representa el segundo estudio en relación al número de pacientes incluidos, por lo que nuestros resultados van a proporcionar una información muy valiosa.

A pesar del elevado número de pacientes que reciben tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la AR observamos que existen muy pocos estudios de genoma completo que analizarían esta asociación. Esto en parte es debido al elevado coste del genotipado y al elevado tamaño muestral que se requiere para la realización de estos estudios. Aunque existe una amplia variación en la práctica clínica se acepta que entre un 10% y 30% de los pacientes reciben terapia biológica. Si revisamos el núme-



ro de GWAS publicados en otras enfermedades IMID en las que también este indicado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ , como por ejemplo en la enfermedad inflamatoria intestinal en el año 2010 fue publicado un GWAS realizado en 94 pacientes pediátricos con enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa tratados con anti-TNF $\alpha$  específicamente con IFX. Para este estudio se utilizó el chip *Illumina Human 550*. Para valorar la eficacia del tratamiento en la enfermedad de Crohn se utilizó el HBI (*Harvey Bradshaw Index*) y para la colitis ulcerosa se utilizó el *score Partial Mayo* a la semana 10 o a la semana 4 después de la tercera dosis del tratamiento. En este estudio se identificaron 6 *loci* asociados a la respuesta al tratamiento de forma significativa ( $P < 5E-02$ ) y solo el *loci 21q22.2/BRWDI* estuvo asociado a la respuesta e el modelo predictivo <sup>(382)</sup>.

Por otra parte y en relación con la AR solo existe un GWAS publicado en pacientes con AR que evalúe factores de riesgo genético asociados a la respuesta a otra terapia biológica distinta a los fármacos de acción anti-TNF $\alpha$ . Wang et al <sup>(383)</sup> han publicado recientemente un estudio que incluye 1.683 pacientes con AR procedentes de 6 ensayos clínicos distintos que recibieron tratamiento con Tocilizumab. Se identificaron 8 *loci* candidatos asociados a la respuesta determinada mediante distintos parámetros de eficacia (i.e.  $\Delta$  DAS28, ACR20, entre otros) a la semana 16 ninguno de estos *loci* había sido vinculado previamente ni a la vía de la IL-6 ni al riesgo de AR. En cualquier caso la interpretación de estos resultados debe hacerse con cautela ya que se han utilizado distintas plataformas de genotipado, una metodología de análisis compleja y los pacientes provienen de diferentes ensayos clínicos.

En los GWAS o inclusive en los estudios que utilizan la estrategia del gen candidato per identificar variaciones genéticas asociadas a la respuesta terapéutica en pacientes con AR no existe un consenso sobre que criterio de respuesta clínica debe utilizarse. El cambio absoluto en el DAS28 ( $\Delta$ DAS28) es un valor de medición de la respuesta atractiva desde el punto de vista estadístico, ya que se trata de una variable continua y por tanto, puede proporcionar mayor poder estadístico cuando el tamaño muestral es bajo o moderado. En contraste, la mejoría clínica definida según los criterios de respuesta EULAR cuantifica la respuesta estratificando a los pacientes en tres categorías y puede reducir el poder estadístico del análisis. Sin embargo, la respuesta EULAR convertida a forma binaria (i.e. buena y moderada respuesta vs no respondedores) es quizás la estrategia mas utilizada en los estudios genéticos por su mayor interpretabilidad clínica <sup>(292,383)</sup>. Considerando estos aspectos y de forma similar al diseño del estudio publicado por Krintel et al, en el presente proyecto se ha realizado el estudio de asociación de genoma completo utilizando ambas estrategias de análisis. Tal y como se comenta en los apartados de metodología y resultados se ha incluido en el análisis tanto la respuesta EULAR como el cambio absoluto en el DAS28, determinados ambos a las 12 semanas de tratamiento.

En el presente proyecto no se ha observado ninguna SNP asociada de forma significativa a escala genómica (i.e.  $P < 5E-08$ ) con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  determinada a las 12 semanas por el índice  $\Delta$ DAS28. Así mismo tampoco se ha identificado ninguna asociación significativa a escala genómica (i.e.  $P < 5E-08$ )

con la respuesta EULAR.

No obstante, al igual que en los GWAS que se han comentado previamente, hemos identificado SNPs con una asociación cuya magnitud debe ser claramente considerada ( $P < 5E-04$  a  $P > 5E-07$ ). Se obtuvieron un total de 212 SNPs situados en 157 *loci* distintos que presentaron una asociación altamente significativa con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  determinada por el índice  $\Delta$ DAS28. En relación a la respuesta EULAR se obtuvieron un total de 253 SNPs situados en 166 *loci* independientes que presentaron una fuerte asociación. En las tablas 32 y 35 se presentan los loci más significativamente asociados en los dos análisis de asociación de genoma completo realizados en relación al  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR a las 12 semanas de tratamiento.

Entre aquellos SNPs que presentaron un poder de asociación con valores entre  $P < 5E-04$  y  $P > 5E-07$ , 18 SNPs situados en loci distintos alcanzaron esta significación estadística con ambas estrategias de análisis (i.e.  $\Delta$ DAS28 y respuesta EULAR) lo que nos sugiere que estos SNPs son firmes candidatos a ser replicados en una muestra independiente.

A su vez, dentro del grupo de SNPs más significativamente asociados a la respuesta ( $P < 5E-04$ ) se han seleccionado también aquellos SNPs situados dentro o cerca de genes funcionalmente implicados en la patología de la AR. De esta forma, se han seleccionado 11 *loci* asociados a la respuesta determinada por el  $\Delta$ DAS28 y 17 loci asociados a la respuesta EULAR, tal y como se observa en las tablas 33 y 36 del apartado de resultados.

Finalmente entre los SNPs que presentaban una mayor significación estadística ( $P < 5E-04$ ) se identificaron 2 SNPs no sinónimos asociados al índice  $\Delta$ DAS28 y también 2 SNPs no sinónimos asociados a la respuesta EULAR, ambas a las 12 semanas de iniciado el tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

En el presente proyecto se han identificado un total de 50 SNPs que presentaron una asociación altamente significativa ( $P < 5E-04$ ) con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  a las 12 semanas de iniciado el tratamiento. El listado final de estas SNPs y sus respectivos *loci* se presenta en la tabla 38. En el anexo 6 se presenta el nombre oficial completo de los genes asociados según el *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) (<http://www.genenames.org/>).

Los estudios de genoma completo han aportado una aproximación revolucionaria al estudio de la genética puesto que criban todo el genoma y por tanto, no dependen del conocimiento existente. Así, se han identificado genes y vías biológicas no vinculados previamente a la etiología de la enfermedad. Este aspecto es clave, puesto que aumenta considerablemente la probabilidad de identificar biomarcadores de aplicación clínica y/o dianas terapéuticas más eficientes.

En nuestro estudio, se han identificado 18 *loci* con una alta evidencia estadística de asociación a la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$ . En muchos de estos loci, la potencial implicación biológica con la respuesta a esta terapia no resulta evidente.

No obstante y tal como se ha comentado, pueden representar nuevas vías biológicas que sean clave en la determinación de la eficacia de este tratamiento. En la tabla 37 se listan aquellos SNPs que han alcanzado una evidencia estadística en las dos estrategias utilizadas (i.e.  $\Delta$ DAS28 y respuesta EULAR). Únicamente dos de estos *loci*, el *HTR1A* y el *NLRP1*, podrían estar asociados funcionalmente con la AR (citadas), tal y como como comentaremos más adelante.

El resto de los 16 *loci* asociados no han sido relacionados hasta la fecha ni con la AR ni con el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . No obstante alguno de estos *loci* identificados podría tener un papel interesante en el sistema inmune, como por ejemplo el gen *RNF19B* que codifica una proteína transmembrana asociada a la citólisis<sup>(384)</sup>. Esta proteína se expresa en las células NK y en los linfocitos T tras la estimulación por parte de determinadas citoquinas proinflamatorias, como la IL-2 y el interferón-beta. Esta proteína participa también en la ubiquitinización como una E3 ubiquitin ligasa. La ubiquitinización es un mecanismo celular de degradación proteínica que se ha ligado a la regulación de diferentes procesos biológicos, incluyendo la respuesta inflamatoria. En nuestro estudio se ha identificado una asociación significativa entre la presencia del alelo A del SNP rs194652 situado en el primer intrón del gen *RNF19B* y una peor respuesta determinada mediante el  $\Delta$ DAS28 y la respuesta EULAR por lo que es un candidato realmente interesante que debe ser analizado con detalle.

Tal y como se ha comentado, entre los SNPs que presentaron una mayor significación estadística ( $P < 5E-04$ ) tanto en el estudio de asociación con la respuesta determinada mediante el  $\Delta$ DAS28 como con la respuesta EULAR se seleccionaron determinados SNPs para incluir en el estudio de replicación en base a una clara relación con la artritis reumatoide. Se seleccionaron SNPs cuyos genes están claramente relacionados con la fisiopatología de la enfermedad (i.e. *TANK*, *CSF1*, *CD44*) y algunos SNPs situados en *loci* de riesgo para desarrollar AR (i.e. *IL6ST*). A fin de facilitar la comprensión de los genes significativamente asociados a la respuesta y con el objetivo de poder agruparlos si es preciso en función de su participación en distintas familias génicas, en el siguiente apartado se describe la información más relevante la mayoría de estos *loci*, independientemente del criterio por el cual se han incluido en el listado final de genes para el estudio de replicación.

#### 4.2.3.- Genes o familias génicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

**Enzimas de la matriz extracelular: *MMP1* (matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)), *MMP3* (matrix metallopeptidase 1 (stromelysin 1, progelatinase)), *ADAM12* (ADAM metallopeptidase domain 12).**

La destrucción enzimática de los componentes de la matriz extracelular (MEC) es el principal mecanismo de lesión del cartílago, tendones y ligamentos en la AR. En particular, la destrucción del cartílago ha sido atribuida a la acción combinada de varias familias de proteasas, cada una de las cuales tiene un sustrato específico.

Entre los distintos grupos de proteasas destacan las endopeptidasas dependientes del cinc que son MMP claves en la degradación de la MEC.

Las MMP son proteasas extracelulares requeridas en numerosos procesos relacionados con el desarrollo, la regeneración y la enfermedad<sup>(384)</sup>. La expresión de las distintas MMP está regulada por determinadas citoquinas como el TNF $\alpha$  y la IL-1 y los efectos de estas citoquinas sobre la expresión de MMP está mediada por la unión de factores de transcripción tales como AP-1 y NF-kB<sup>(385)</sup>.

En relación a las MMP hemos observado una asociación entre el alelo menor de los SNPs rs1144396 y rs1010698, situados a 10,1 kb del gen *MMP1* ( $P=2,33E-04$ , OR=1,89) y a 5,5 kb del gen *MMP3* ( $P=3,30E-04$ , OR=0,54) y la respuesta EULAR.

Las metaloproteasas de la matriz 1 y 3 (MMP1 (colagenasa I) y MMP3 (estromelisi-na) ) tienen un papel importante en la destrucción articular observada en la AR y la artrosis (OA). Abd-Allah et al<sup>(386)</sup> publicaron recientemente un estudio cuyo objetivo fue analizar si determinados polimorfismos funcionales situados en la región promotora de los genes *MMP1* y *MMP3* estaban asociados con la AR y la artrosis. Se genotiparon los polimorfismos MMP1 (-1607 1G/2G) y MMP3 (-1171 5A/6A) en 100 pacientes con AR, 100 pacientes con OA y 100 individuos control. Se observó una diferencia significativa entre los pacientes con OA y controles en relación al polimorfismo del gen *MMP1* pero no entre los pacientes con AR y el grupo control. El relación al gen *MMP3* se observó que el genotipo 6A/6A se identificó de forma significativamente más frecuente entre los pacientes con AR y artrosis que entre los controles. Sin embargo el haplotipo 2G-6A se presentó con mayor frecuencia entre los pacientes con AR y OA que entre los controles (28%, 30% y 8%, respectivamente). En este estudio también se determinaron las concentraciones plasmáticas de la MMP1 y MMP2, no observándose diferencias significativas entre los tres grupos estudiados. Estos resultados sugieren que determinados polimorfismos situados en la región promotora de los genes *MMP1* y *MMP3* pueden representar variaciones genéticas comunes a la susceptibilidad de desarrollar AR y artrosis. Así mismo, estos polimorfismos pueden ser más útiles en la predicción del daño articular que la determinación de las concentraciones plasmáticas de MMP1 y MMP3.

Chen et al<sup>(387)</sup> estudiaron los polimorfismos rs1799750 del gen *MMP1*, rs3025058 y rs679620 del gen *MMP3* y rs495366 localizado entre los genes *MMP1* y *MMP3*. En este estudio se observó que el genotipo AA del SNP rs495366 estaba asociado con un aumento del riesgo de desarrollar AR en sujetos menores de 40 años.

Ye et al<sup>(388)</sup>, estudiaron un grupo de pacientes con AR y FR positivo y determinados polimorfismos situados en los genes *MMP1* y *MMP3* (-1607 1G/2G y -1612 5A/6A respectivamente) entre otros. En estos pacientes se analizó la asociación de estos polimorfismos con la discapacidad funcional, utilizando el HAQ y la clasificación funcional de Steinbrocker. En este estudio se detectó una tendencia de asociación con el polimorfismo MMP3 -1612 5A/6A ( $P= 0,082$ ) pero no se objetivaron evidencias de asociación con el polimorfismo MMP1-1607 1G/ 2G y la discapacidad funcional.

De forma similar a la implicación funcional de las MMP en la fisiopatología de la AR existen numerosas evidencias que implican a otras familias de enzimas un papel importante en la destrucción de la MEC. La familia ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) es una familia de proteasas que también participan de forma importante en la degradación de la MEC <sup>(45,66)</sup>.

En nuestro estudio hemos observado una asociación entre el SNP rs1710313 situado en el diecisieteavo intrón del gen *ADAM12* y la respuesta EULAR ( $P= 4,40E-04$ , OR=1,85).

Las ADAMs son una familia de proteínas transmembrana o secretadas, que tienen un papel importante en la regulación del fenotipo celular a través de sus efectos sobre la adhesión celular, la migración, la proteólisis y la señalización. Existen 23 ADAMs en el ser humano. Los sustratos de las distintas ADAMs son variados y consisten en factores de crecimiento, receptores y citoquinas que pueden ser procesadas por uno o más miembros de la misma familia. Por ejemplo, varias enzimas ADAMs pueden escindir la proteína precursora de la proteína amiloide, pero la proteína ADAM17 es la única ADAM conocida que libera el TNF $\alpha$  a partir de su forma unida a la membrana celular <sup>(389)</sup>.

Una enzima importante en esta familia, es la ADAM12 que es una metaloproteínasa metzincina con una actividad catalítica que participa en varios procesos patológicos y que sobre todo se ha descrito relacionada con varios tipos de cáncer <sup>(390)</sup>. De forma específica se ha identificado como un potencial biomarcador de cáncer de mama y asociado a la progresión tumoral <sup>(391)</sup>. De hecho, ADAM12 ha sido implicada en una gran variedad de enfermedades a través de distintos mecanismos aunque en la mayoría de los casos no son del todo conocidos.

Entre las enfermedades musculoesqueléticas se la ha relacionado básicamente con la artrosis, trastorno que se caracteriza por la aparición tardía de la degeneración del cartílago articular y que implica la activación de determinadas proteasas extracelulares. Determinados polimorfismos del gen *ADAM12* se han asociado con los cambios radiológicos en pacientes con OA en un grupo de pacientes caucásicos de Estonia <sup>(392)</sup> aunque estos resultados no han podido ser replicado en un estudio británico en el que se incluyeron 1.040 pacientes con OA de rodilla y 1.004 pacientes con OA de cadera <sup>(393)</sup>.

Hasta la fecha no hemos identificado estudios que analicen la relación entre la ADAM12 y la AR. En este sentido nuestros resultados aportarían las primeras evidencia funcionales de relación entre determinados polimorfismos del gen *ADAM12* y la artritis reumatoide a través de su relación con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Si se ha identificado una relación entre la ADAMTS12 (*ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1, motif, 12*) y la AR. Esta proteinasa es un enzima que interactúa con los fragmentos degradables de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago y se ha postulado que determinados polimorfismos en el gen que la codifica pueden estar asociados con la susceptibilidad de desarrollar AR <sup>(394)</sup>.

En resumen, podemos concluir que a pesar de que existen fuertes evidencias que sustentan la implicación de determinadas proteasas (i.e. MMP1, MMP y ADAM12) en la fisiopatología de la artritis reumatoide, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que determine la relación existente entre determinados polimorfismo de los genes que las codifican y la respuesta a ningún tipo de tratamiento en pacientes con AR.

**Receptores de la serotonina: *HTR1A (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled)*, *HTR2A (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled)*, *HTR3A (5-hydroxytryptamine (serotonin)***

El sistema de la serotonina ha sido estudiado principalmente en relación con la neurociencia y las enfermedades psiquiátricas, sin embargo existe numerosa documentación que implica el sistema de la serotonina en múltiples funciones y su participación en la actividad de distintos tejidos. Hasta la fecha se han descrito 7 tipos de receptores de serotonina con el correspondiente subgrupo<sup>(395)</sup>. En el presente proyecto se ha identificado que los alelos menores de tres SNPs situados próximos a 3 de estos tipos de receptores se asociaban de forma significativa con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR.

En nuestro estudio se observó una asociación significativa ( $P=3,13E-04$ , OR=0,81) entre SNP rs897685 situado en la región intergénica a una distancia de 3,1 kb del gen *HTR3A (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic)* del cromosoma 11 y la respuesta determinada por  $\Delta$ DAS28. Este gen codifica la subunidad A de tipo 3 para el receptor de la 5-hidroxitriptamina (i.e. serotonina), una hormona que funciona como un neurotransmisor. Los receptores de la 5-HT se han detectado en células mononucleares, linfocitos y están presentes en las neuronas del sistema nervioso central y periférico.

Recientemente Seidel et al<sup>(396)</sup> sugirieron que el proceso inflamatorio podría estar inducido por la estimulación de determinados subtipos de receptores 5-HTR3A a partir de la prostaglandina E2 (PGE2). Es conocido que la PGE2 regula la angiogénesis en el tejido de granulación inflamatorio y participa en la regulación de la liberación del TNF $\alpha$ <sup>(389)(390)</sup>.

Una segunda asociación ha sido identificada en nuestro estudio en relación al sistema de la serotonina, fue con el SNP rs7333963, situado a 386 kb del gen *HTR2A (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled)* ( $P=1,94E-04$ , OR= 1,71). Existen evidencias que indican que el gen *HTR2A* activa la fosfolipasa C- $\beta$  desencadenando una rápida y transitoria fosforilación de la JAK2 (*Janus kinase 2*) en respuesta a la serotonina. Kling et al<sup>(395)</sup> han observado en un estudio que incluía 292 pacientes con AR y 524 sujetos control, una asociación entre el SNP rs6313 próximo al gen *HTR2A* y la susceptibilidad de desarrollar la AR. Además, en este estudio se observó que la densidad de los receptores de serotonina 5-HT-R2A estaba considerablemente más reducida en pacientes con AR con respecto a los sujetos control. También se objetivo una asociación entre la gravedad de la enfermedad y la baja densidad de receptores. Este hallazgo fue posteriormente

replicado por el mismo grupo en otro estudio que incluyó 2.158 pacientes del registro EIRA (*Epidemiologic Investigation of Rheumatoid Arthritis*).

Por último, hemos observado una asociación entre el SNP rs7716031 del cromosoma 5 ubicado a 530 kb del gen *HTR1A* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled*) y la respuesta valorada tanto por el  $\Delta$ DAS28 como por la respuesta EULAR. Este gen codifica el receptor de una proteína G acoplada a la serotonina, y también pertenece a la subfamilia de los receptores 5-hidroxitriptamina.

El receptor 5-HT1A desempeña un papel importante en la formación de la sinapsis y la migración neuronal durante el desarrollo. Por lo tanto, el receptor 5-HT1A es un candidato natural para el estudio de los genes relacionados con los trastornos afectivos y otros trastornos relacionados con el estrés. No obstante, el receptor 5-HT1A también tiene un papel importante en la regulación de la proliferación de los linfocitos circulantes<sup>(397)</sup>. En un estudio en el que se incluyeron pacientes con LES y sujetos sanos, se observó que en los pacientes con LES existía una hipometilación de la región promotora del gen *HTR1A*, así como un aumento de las concentraciones del receptor 5-HTR1A en sangre periférica con respecto a los sujetos control<sup>(398)</sup>.

Un de los aspectos más destacables de la asociación entre los genes de los receptores de la serotonina y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la AR es que, a diferencia de otras familias génicas, los tres *loci* están ubicados en cromosomas diferentes. Este hecho descarta la existencia de desequilibrio de ligamiento entre las diferentes variantes como fenómeno causal y aumenta claramente el valor de la significación de esta asociación funcional.

La relevancia de esta asociación es aun más evidente si analizamos la relación que existe entre la depresión y la AR. Está establecido que entre un 13% y 20% de pacientes con AR padecen una depresión asociada<sup>(399)</sup> y en el registro británico de pacientes con AR que habían iniciado tratamiento anti-TNF $\alpha$  se observó que el 19% presentaba una depresión<sup>(400)</sup>. En un estudio publicado por Hider et al<sup>(401)</sup> que incluía 160 pacientes con AR de larga evolución tratados con anti-TNF $\alpha$  se objetivó que aquellos pacientes que presentaban una depresión asociada respondían peor al tratamiento anti-TNF $\alpha$  y una menor reducción en el DAS28. Así mismo, también en pacientes con Espondilitis anquilosante se ha observado una mejoría de la depresión asociada al iniciar el tratamiento anti-TNF $\alpha$ <sup>(402)</sup>.

Es también muy interesante un estudio publicado por Seidel et al, en el que se evalúa la eficacia de inyecciones intraarticulares del antagonista del receptor del 5-HTR3A y se plantea como una opción terapéutica alternativa a la inyección interarticular de glucocorticoides<sup>(403)</sup>.

Recientemente ha sido publicado un primer ensayo clínico randomizado con pacientes con depresión mayor resistentes al tratamiento con antidepresivos convencionales. Los pacientes fueron randomizados en dos grupos de 30 pacientes cada uno en dos brazos de tratamiento, un grupo recibió placebo y el otro grupo

fue tratado con infliximab. Se evaluó la eficacia clínica a los 3 meses de tratamiento mediante la escala HRSD (*Hamilton Rating Scale for Depression*) y la PCR. En este estudio no se observó una eficacia clínica significativa pero los pacientes que presentaban un valor de PCR o una concentración de TNF $\alpha$  en plasma más elevada si presentaron una mejoría sintomática<sup>(404)</sup>.

### **Genes del inflamosoma: *NLRP1* (*NLR family, pyrin domain containing 1*) y *NLRP3* (*NLR family, pyrin domain containing 3*)**

El inflamosoma es un complejo multiproteico formado por la caspasa 1, PYCARD (*PYD and CARD domain containing*), una proteína NALP y en ocasiones por una caspasa 5 u 11. La composición exacta del inflamosoma depende del activador que inicia el ensamblaje. El inflamosoma tiene un papel fundamental en la inmunidad innata ya que participa en la activación de la caspasa 1 y la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  o la IL-18<sup>(405)</sup>.

Se han identificado tres tipos de inflamosomas: el inflamosoma NALP1 que se compone de las proteínas NALP1, ASC, caspasa-1 y caspasa-5; el inflamosoma NALP2/3 que contiene la proteína NALP2 o NALP3 entre otras proteínas; y un tercer inflamosoma que se compone de las proteínas NLRC4 (*NLR family, CARD domain containing 4*) y caspasa-1. Las proteínas NALPs e NLRC4 son miembros de la familia del NLR (*NOD-Like Receptor*) que son proteínas que se localizan en el citoplasma<sup>(405, 406)</sup>.

En nuestro estudio hemos identificado una asociación entre el SNP rs758831 situado a 217 kb del gen *NLRP1* y la respuesta clínica determinada por el  $\Delta$ DAS28 ( $P=2,62E-04$ ) y por la respuesta EULAR ( $P=3,8E-04$ , OR= 2,08).

Otros polimorfismos situados en el gen *NLRP1* se han descrito asociados a la susceptibilidad de desarrollar enfermedades autoinmunes asociadas al vitiligo<sup>(407)</sup>. Este grupo de enfermedades son: la enfermedad tiroidea autoinmune, la diabetes autoinmune en adultos, la AR, la psoriasis, la anemia perniciosa, el LES y al enfermedad de Addison. La evidencia existente sugiere que la sobre-expresión del gen *NLRP1* induce a la apoptosis celular<sup>(408)</sup>.

En otro estudio realizado en pacientes con AR de origen asiático se observó una asociación entre el SNP rs878329 situado en el gen *NLRP1* y la susceptibilidad de desarrollar la AR. Los pacientes que presentaban el genotipo CC tenían un menor riesgo de desarrollar la AR en comparación con los pacientes que tenían el genotipo GG (OR=0,42). Los individuos con el genotipo GG tenían un riesgo significativamente más elevado de desarrollar AR (OR= 2,38) lo que indica que el alelo G podría ser un alelo de riesgo para la AR<sup>(409)</sup>.

Además, en nuestro estudio hemos observado una asociación entre el alelo menor del SNP rs10925006 a 27,4 kb del gen *NLRP3* y la respuesta EULAR ( $P= 3,14E-04$ , OR=1,92). En el año 2001, el gen *NLRP3* fue identificado como el gen responsable de los síndromes MWS (*The Muckle-Wells*), FCAS (*Familial Cold Autoinflammatory*



*Síndrome*) y del síndrome CINCA (*Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular*). Se ha constatado que las mutaciones identificadas en este gen conducen al aumento de la activación del inflamosoma, dando como resultado una producción aberrantemente elevada de IL-1 $\beta$  <sup>(405,410)</sup>.

Cummings et al <sup>(411)</sup> realizaron un estudio donde analizaron los 14 genes *NLRP* conocidos, en 547 pacientes con enfermedad de Crohn, 60% de los cuales procedían del estudio de la WTCCC. En este estudio se identificaron varios SNPs asociados con la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad de Crohn y con determinados fenotipos de esta enfermedad. De estos SNPs, 4 SNPs que estaban situados en el gen *NLRP3* estaban asociados ( $P < 5E-02$ ) a la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad de Crohn. Los SNPs rs4925648 y rs10925019 fueron los que estaban asociados de forma más robusta con la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad ( $P = 1E-03$ , OR=1,6 y  $P = 6,5E-4$ , OR= 1,65 respectivamente). En un sub-análisis de este estudio se observó una interesante asociación entre 7 SNPs (rs2137722, rs11653832, rs11656977, rs11654176, rs925596, rs6502870, rs11657747) situados en el gen *NLRP1* y las manifestaciones cutáneas de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En relación a la AR, Kastbom et al observaron que determinados polimorfismos en el gen *NLRP3* (i.e. *CIAS1*) y en el gen *TUCAN* (i.e. *CARD8*) presentaban una asociación significativa con la presencia del EC y de anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR. Así mismo se observó que la combinación *CIAS1/TUCAN* -/- era más frecuente de forma significativa en el grupo de pacientes con AR y específicamente con las formas más graves. Los autores proponen que los pacientes doble negativos pueden ser candidatos a recibir tratamiento anti-TNF $\alpha$  <sup>(412)</sup>.

En nuestro estudio también hemos identificado una asociación entre el SNP rs12982016 situado en el sexto intrón del gen *NLRP13* y la respuesta determinada tanto por el  $\Delta$ DAS28 como por la respuesta EULAR al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Este *loci* también ha sido asociado como variante de riesgo a la enfermedad de Crohn en algunos estudios pero sin embargo la asociación no ha podido ser replicada en otras cohortes <sup>(411,413)</sup>.

Aunque existen claras evidencias de la asociación entre determinados polimorfismos de los genes de la vía del inflamosoma y las enfermedades autoinmunes, esta es la primera vez que se vinculan de forma clara con la respuesta a un determinado tratamiento en una enfermedad autoinmune.

### ***CSF-1 (Colony-stimulating factor-1)***

En el presente proyecto se ha identificado una asociación significativa entre el SNP rs333958 situado a 16,7 kb del gen *CSF-1* y la respuesta clínica determinada por  $\Delta$ DAS28. El gen *CSF-1* tiene un papel importante en la inmunidad innata y se ha relacionado con determinados procesos patológicos como el cáncer, determinadas enfermedades inflamatorias, incluyendo el LES, la AR, la aterosclerosis y con enfermedades metabólicas como la obesidad <sup>(414)</sup>.

La proteína codificada por este gen es una citoquina que regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de los fagocitos mononucleares, regula la osteoclastogénesis y también moviliza las células progenitoras endoteliales de la médula ósea hacia la sangre periférica. También interviene en los procesos de angiogénesis y neovascularización, ambos fundamentales en la patogénesis de la AR <sup>(414, 415, 416)</sup>.

El producto del gen *CSF-1* es expresado por los fibroblastos sinoviales de los pacientes con AR y junto con el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), contribuye a la diferenciación de los macrófagos sinoviales en osteoclastos que tienen un papel clave en la destrucción ósea en la AR. El aumento de CSF-1 en el plasma de los pacientes con AR se correlaciona con un aumento del número de monocitos CD14 + y CD16 +, que a su vez expresan altas concentraciones de TLR-2 contribuyendo a la persistencia de la inflamación articular en la AR <sup>(417)</sup>. Por otro lado, el TNF $\alpha$  y el CSF-1 han demostrado tener un efecto sinérgico sobre la proliferación de los monocitos y macrófagos y la diferenciación de los osteoclastos <sup>(418, 419)</sup>.

Hasta la fecha, no se han publicado estudios que analicen la expresión de CSF-1 y el tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en las enfermedades IMID. No obstante existen estudios en pacientes con gonoartritis (i.e. artrosis de rodilla) (CITA) y sinovitis villonodular pigmentada (SVP), en donde se demuestra la existencia de una sobre expresión de CSF1 en el tejido sinovial de estos pacientes. En este estudio realizado en pacientes con SVP se observó que tras la inyección intra-articular de anti-TNF $\alpha$  (i.e. etanercept) existía una mejoría clínica pero no se observaba una variación en la expresión sinovial de CSF-1<sup>(415)</sup>. Por otra parte, se ha observado que esta citoquina tiene un papel importante en el desarrollo de la inflamación en modelos de artritis reumatoide sugiriendo que el bloqueo de CSF-1 puede tener un papel relevante en pacientes con AR <sup>(420)</sup>.

### ***Interleukin 6 signal transducer (IL6ST)***

La proteína codificada por este gen es un transductor de señal compartido por muchas citoquinas, como la IL6, el CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*), el LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) y el OSM (*Oncostatin M*). Esta proteína funciona como una parte del complejo de receptores de citoquinas y su activación es dependiente de la unión de las citoquinas a sus receptores.

Este *loci* ha sido recientemente asociado a la susceptibilidad de desarrollar AR en un estudio de GWAS publicado por Sthal et al <sup>(321)</sup>. Este estudio consistió en un meta-análisis que incluía 5.539 pacientes con AR anti-CCP y/o FR positivos y 20.169 controles de origen caucásico del norte de Europa. Se seleccionaron 34 SNPs para el estudio de replicación en una muestra independiente de 6.768 pacientes. De éstos, 7 SNPs presentaron una asociación significativa con el riesgo de desarrollar AR, uno de lo cuales se localizaba en el gen *IL6ST* ( $P=2, E-04$ , OR=0,85).

En otro estudio reciente publicado por Viatte et al <sup>(421)</sup> se investigaron 37 *loci* de susceptibilidad para la AR en una cohorte de 2.040 pacientes con AR y anticuerpos anti-CCP negativos y en una cohorte de 4.068 pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos. En este estudio se observó que los polimorfismos próximos a los genes *ANKRD55/IL6ST*, *BLK* y *PTPN22* presentaban una asociación con la susceptibilidad a desarrollar AR en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-CCP negativos.

En un estudio publicado por Hassan et al <sup>(293)</sup> en el año 2010, donde se incluyeron 1.050 pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$ , se analizó la asociación entre el polimorfismo rs 8192284 del gen *sIL6-R* y la respuesta al tratamiento. Este polimorfismo había sido correlacionado previamente con una mayor producción de receptores solubles de la IL-6 tanto en población caucásica como asiática y se había hipotetizado que formas más graves de AR en pacientes portadores del genotipo CC podían responder peor al tratamiento anti-TNF $\alpha$  debido a una mayor expresión de IL6. A pesar de que este gen podía ser un *locus* candidato muy robusto, Hassan et al <sup>(293)</sup> no observaron una asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

En nuestro estudio se identificó una asociación entre el SNP rs10940495, situado en el cuarto intrón del gen *IL6ST* y la respuesta al tratamiento determinada por el  $\Delta$ DAS28 ( $P= 3,31E-04$ , OR=0,74). Aunque este polimorfismo en concreto no se ha identificado asociado al riesgo de desarrollar AR, si se había identificado como un SNP de riesgo para el síndrome metabólico <sup>(422)</sup>. Mientras el mecanismo molecular que vincula el síndrome metabólico y la inflamación no es del todo conocido, varios estudios centran su atención en las citoquinas liberadas por el tejido adiposo como posibles mediadores de la inflamación. La IL6 tiene un papel fundamental como mediador en la respuesta inflamatoria y al mismo tiempo su concentración plasmática está elevada en pacientes con obesidad, en pacientes con resistencia a la insulina y en la diabetes tipo 2 <sup>(423)</sup>.

Este gen es un firme candidato por su asociación con la susceptibilidad de desarrollar AR y por su papel en la señalización de la vía de la IL-6 estrechamente relacionada con el TNF $\alpha$ , estando ambas citoquinas muy implicadas en la fisiopatología de la enfermedad y su bloqueo representa una de las estrategias más novedosas y eficaces en el tratamiento de la AR.

### ***Methionine sulfoxide reductase A (MSRA)***

En nuestro estudio se identificó una asociación significativa entre el SNP rs12679609 situado en el sexto intrón del gen *MSRA* y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  determinada por el  $\Delta$ DAS28. Este gen codifica una enzima implicada en la reparación del daño oxidativo de las proteínas de la piel por medio del sistema tioredoxina-reductasa. La *MSRA* es una proteína ubicua, que probablemente tienen la misma función en otros tipos de tejidos o células, controlando así el estado redox celular. Además, la *MSRA* ha demostrado estar involucrada en la patogénesis de determinadas enfermedades autoinmunes como por ejemplo el vitíligo <sup>(424)</sup>.

En un estudio realizado por Martín et al <sup>(425)</sup> se ha podido identificar una asociación entre el SNP rs10903323 ubicado en el gen *MSRA* y el riesgo de desarrollar la AR en población española. La presencia de una variación en este gen podría modificar la actividad del enzima o bien su concentración, alterando la regulación del estado redox y en consecuencia la apoptosis celular. Todos estos factores pueden conducir a una mayor resistencia de las células T autorreactivas a la apoptosis mediada por el TNF $\alpha$  <sup>(425, 426)</sup>.

El SNPs rs10903323 del mismo gen, también fue estudiado por este grupo para determinar una posible asociación con el riesgo cardiovascular en pacientes con AR <sup>(426)</sup>. El alelo menor de este polimorfismo estuvo asociado ( $P=4E-02$ ) con el aumento del riesgo de presentar un evento cardiovascular en pacientes con AR cuando se ajustaba el análisis por la presencia de anticuerpos anti-CCP.

En nuestro estudio otro SNP del gen *MSRA*, el SNP rs12679609, presentó una asociación significativa con la respuesta  $\Delta$ DAS28 al tratamiento anti-TNF $\alpha$  ( $P=2,8E-4$ , OR=1,5). Aunque este locus puede estar asociado con la susceptibilidad a desarrollar AR y al riesgo cardiovascular en estos pacientes, no había sido estudiado previamente en relación a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Nuestros resultados sugieren la necesidad de llevar a cabo más estudios que confirmen esta asociación, tanto en población española como en otros grupos poblaciones.

### ***IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein 5)***

El efecto del IGFBP5 en las células de la membrana sinovial, no es del todo conocido, sin embargo su participación en la regulación y proliferación de otras líneas celulares como por ejemplo los condrocitos y los mioblastos sugiere que también podría estar implicado en la función de los fibroblastos sinoviales. El producto de este gen se expresa en elevadas concentraciones en los cultivos de fibroblastos sinoviales de pacientes con AR en comparación con fibroblastos sinoviales procedentes de pacientes con artrosis <sup>(427)</sup>.

Recientemente se ha identificado una interacción entre IGFBP5 y el TNFR1. Se ha observado que el IGFBP5 induce la expresión del gen *TNFR1* a la vez que interactúa con el propio receptor TNFR1 y esta interacción puede ser bloqueada por el TNF $\alpha$ . Los autores proponen que el IGFBP5 es un nuevo ligando del TNFR1 que funcionaría como un inhibidor competitivo del TNF $\alpha$  a través de la vía del NF-kB <sup>(428)</sup>.

En nuestro estudio se observó una asociación entre el SNP rs888186 situado en a 7,4 kb del gen *IGFBP5* y la respuesta evaluada por  $\Delta$ DAS28 a las 12 semanas del inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$  ( $P=4,06E-04$ , OR=0,33).

### ***CSF3R (colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte))***

En nuestro estudio se ha observado una asociación entre el SNP rs7540413 situado a 91,5 kb del gen *CSF3R* y la respuesta EULAR ( $P=4,74E-04$ ,  $OR=1,88$ ).

La proteína codificada por este gen es uno de los receptores del factor estimulante de colonias (*GM-CSF* o *granulate-macrophage stimulating factor*), una citoquina que regula la producción, diferenciación y función de los granulocitos. A su vez, también participa en la regulación de algunos procesos relacionados con la adhesión o el reconocimiento celular. El GM-CSF es una citoquina soluble que también promueve la generación, la supervivencia y la activación de células del compartimiento mielóide, en particular los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. El GM-CSF también regula numerosas funciones de los macrófagos tisulares maduros, por ejemplo, la adhesión celular, la expresión de receptores de reconocimiento de patógenos y la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-12, IL-18, IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos 1 y M-CSF), la fagocitosis y la destrucción microbiana <sup>(429, 430)</sup>.

En relación a la proteína codificada por este gen existen suficientes evidencias que apoyan su implicación con la fisiopatología de la AR por lo que es un claro gen candidato de respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$  en la artritis reumatoide. Las concentraciones elevadas de GM-CSF y de su receptor en el líquido sinovial y en el plasma de sujetos con AR y la sobreexpresión de los receptores de GM-CSF en las células del tejido sinovial y en las células mononucleares circulantes, así como su producción por parte de los condrocitos, sugieren un papel potencial de esta citoquina en la AR. Determinados estudios realizados con modelos animales han apoyado esta hipótesis. Se ha observado que la sobreexpresión de GM-CSF produjo una inflamación acelerada y más grave en los ratones con AR inducida que en los ratones de control. A la inversa, una deficiencia en GM-CSF ha demostrado ser protectora en varios modelos de artritis inducida. Estos datos sugieren que el GM-CSF juega un papel clave en la artritis y que el bloqueo de esta vía puede proporcionar beneficios terapéuticos <sup>(431)</sup>.

### ***TANK (TRAF family member-associated NFKB activator)***

Los TRAF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) son una familia de proteínas asociadas a la transducción de la señal de varios miembros de la superfamilia de receptores del TNF $\alpha$ . La proteína codificada por el gen TANK se encuentra en el citoplasma y puede unirse a TRAF1, TRAF2, o al TRAF3, inhibiendo su función <sup>(431)</sup>.

El TNFRSF1B (*TNF receptor superfamily member 1B*) conocido como receptor del TNFR2, es un receptor esencial expresado en la superficie de los linfocitos T. Se ha hipotetizado que determinados polimorfismos de los genes que codifican a las proteínas involucradas en la vía de señalización del TNF $\alpha$  puedan tener importantes implicaciones en la regulación del TNF $\alpha$  y por lo tanto un efecto directo en la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  <sup>(432)</sup>.

En este sentido un estudio publicado por el grupo de Anne Barton <sup>(432)</sup> analizó en una cohorte de 642 pacientes británicos con AR, 73 polimorfismos localizados en 6 genes de la vía del TNFRSF1B. Los genes analizados fueron: el gen *TANK*, *MAP3K1* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*), *MAP3K14* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*), *DUSP1* (*dual specificity phosphatase 1*), *IKBKAP* (*inhibitor of  $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein*) y *HIV-1* (*Rev binding protein (HRB)*). En este estudio se observó una asociación significativa entre los SNPs rs96844 (*MAP3K1*) y rs4792847 (*MAP3K14*) y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en la etapa de descubrimiento ( $P < 5E-02$ ). No obstante esta asociación no se confirmó en el estudio de replicación en una cohorte independiente de 428 pacientes con AR. En este estudio tampoco se objetivó una asociación entre el resto de polimorfismos en estos genes, incluido el gen *TANK* y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ .

En nuestro estudio GWA se ha observado una asociación entre el SNP rs10164859 situado a 101,7 kb del gen *TANK* ( $P = 8,43E-05$ ,  $OR = 3,51$ ) con la respuesta EULAR. En el artículo publicado por Barton y cols. no está disponible el SNP del gen *TANK* genotipado para poder establecer una comparación con nuestros resultados.

En otro estudio, Morales et al <sup>(433)</sup> identificaron una asociación entre el polimorfismo rs20575 del gen *TRAILR* (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*) con la respuesta EULAR a los 3 meses (CC 91.7% vs CG/GG 68.2%;  $P = 0.019$ ) y a los 6 meses de tratamiento (CC 82.6% vs CG/GG 56.1%;  $P = 0.019$ ) (421). Sin embargo este estudio no incluía una fase de replicación. Este estudio y los resultados del presente proyecto sugieren la importancia del estudio de estas vías de señalización en la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Nuestro estudio es el primer estudio que identifica una asociación significativa entre un polimorfismo en el gen *TANK* y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide.

### ***EMCN (Endomucin)***

En nuestro estudio se ha identificado una asociación entre el SNP rs7680366 situado a 132,8 kb del gen *EMCN* y la respuesta EULAR ( $P = 9,73E-05$ ,  $OR = 1,97$ ). Este *locus* ha sido asociado a la susceptibilidad de desarrollar AR en población japonesa como comentaremos a continuación.

La interacción entre la célula y la matriz extracelular (ECM) en muchos tipos de tejidos está mediada por un conjunto de integrinas que forman “el complejo de adhesión focal o la placa de adhesión”. La formación de complejos de adhesión focal está regulada por la interacción proteína-proteína y la fosforilación de las proteínas. Se han descrito varias macromoléculas extracelulares que interfieren en la interacción celular con la ECM; tales moléculas incluyen a los proteoglicanos, las glicoproteínas y las sialoglicoproteínas.

La EMCN es una sialoglicoproteína similar a la mucina que está codificada por el gen *EMCN* e interfiere en el ensamblaje de los complejos de adhesión focal

e inhibe la interacción entre las células y la matriz extracelular. La endomucina se expresa en las células endoteliales vasculares en una variedad de tejidos, incluyendo el corazón, la piel y el riñón. Si bien hasta la fecha no se ha identificado la expresión de la endomucina en el tejido sinovial, se conoce que su expresión está estimulada por la acción del TNF $\alpha$  <sup>(434)</sup>.

Nishimoto et al <sup>(435)</sup> identificaron la asociación entre el SNP rs3775369 del gen *EMCN* y la susceptibilidad de desarrollar AR, utilizando dos muestras independientes de pacientes japoneses con AR ( $P=7,5E-03$ ,  $OR=1,20$ ). Esta asociación fue más evidente en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-CCP positivos ( $P=1,5E-03$ ,  $OR=1,17$ ).

### ***SLC22A5 (solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5)***

Este gen codifica una de las proteínas transportadoras de cationes orgánicos expresada en el hígado, el riñón y el intestino. Esta familia de proteínas son importantes para la eliminación de muchos cationes endógenos orgánicos de pequeño tamaño, así como una amplia gama de fármacos y toxinas ambientales.

La proteína codificada es una proteína integral de la membrana plasmática que funciona como un transportador de cationes orgánicos y como un transportador dependiente de sodio de alta afinidad para la carnitina.

El transportador de cationes de carnitina consta de tres isoformas, el OCTN1 (*SLC22A4*) y el OCTN2 (*SLC22A5*) en seres humanos y animales y el OCTN3 (*Slc22a21*) solo en animales. Estos transportadores son fisiológicamente esenciales para mantener las concentraciones apropiadas de carnitina en los tejidos mediante la regulación de su transporte a través de la membrana durante la absorción intestinal, la distribución tisular y la reabsorción renal. Entre ellos, el OCTN2 es un transportador dependiente de sodio de alta afinidad y se ha descrito que una variación genética funcional origina la deficiencia primaria de carnitina sistémica. <sup>(436,437)</sup>.

Dado que la carnitina es esencial para la beta-oxidación de la cadena larga de los ácidos grasos para producir ATP (*Adenosine TriPhosphate*), los polimorfismos en el gen *SLC22A5* puede causar una variedad de manifestaciones, incluyendo cardiomiopatía, debilidad del músculo esquelético, el hígado graso y la infertilidad masculina, entre otros.

Además la región cromosómica 5q31 que contiene estos genes se ha relacionado recientemente con trastornos autoinmunes. Aunque el mecanismo no está claro, ciertos polimorfismos del gen *SLC22A4* y *SLC22A5* están asociados con una mayor susceptibilidad de desarrollar la AR, la enfermedad de Crohn y el asma <sup>(436, 437)</sup>. En la enfermedad de Crohn, la asociación se observó entre variantes funcionales situados en estos 2 genes cercanos entre sí, *SLC22A4* y *SLC22A5* <sup>(436)</sup>.

Tokuhiro et al <sup>(437)</sup> observaron una asociación entre la SNP rs3792876 del gen *SLC22A4* y la susceptibilidad de desarrollar la AR en una cohorte de individuos japoneses. No obstante esta asociación y la asociación con el haplotipo SLC22A4/SLC22A5 no fue reproducida en cohortes caucásicas incluyendo, un estudio en pacientes con AR de origen español <sup>(438, 439, 440)</sup>.

En nuestro estudio hemos identificado un polimorfismo, el SNP rs274550, situado en el octavo intrón del gen *SLC22A5* asociado a la respuesta EULAR ( $P= 3,30E-04$ , OR=2,13). La implicación de las proteínas transportadoras en el metabolismo de determinados fármacos y la asociación de este *locus* con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ , lo convierten en un candidato idóneo para posteriores estudios de replicación génica y de validación funcional.

### ***SLC24A3 (solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger member 3)***

También en nuestro estudio hemos identificado una asociación ( $P=2,93$ , OR=1,86) entre el SNP rs6046010 situado en el segundo intrón del gen *SLC24A3* y la respuesta EULAR en pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$ .

Este gen codifica una proteína intercambiadora de cationes dependiente de K (NCKX3 o *potassium-dependent sodium/calcium exchanger 3*). Esta proteína se expresa en las células dendríticas y regula principalmente el transporte de calcio en estas células. Shumilina et al. han analizado la expresión de las diferentes isoformas de esta proteína en células dendríticas de ratones. En este estudio se ha observado que la isoforma NCKX1 bloquea el efecto de la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) en estas células. La vitamina D es fundamental para la regulación de la homeostasis del calcio en las células dendríticas. También observaron que NCKX1 regula la expresión de CD86 en las células presentadoras de antígeno, que es conocida por su interacción con los linfocitos T y es esencial para la activación de las células T *naïve* y su posterior diferenciación. Por tanto en este estudio se demostró por primera vez que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> disminuía la expresión de CD86 en las células dendríticas a través de la regulación del NCKX <sup>(441)</sup>.

### ***TSLP (thymic stromal lymphopoietin)***

La TSLP es una citoquina similar a la IL-7 que actúa a través de su unión al receptor (i.e. TSLPR). La TSLP se expresa primariamente en las células epiteliales, incluyendo los queratinocitos, mientras que el receptor de TSLPR está expresado en células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, linfocitos T, linfocitos B y células mieloides dendríticas CD11c+. La TSLP activa las células mieloides dendríticas CD11c+, permitiendo la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en células *Th2* productoras de TNF $\alpha$ , de esa forma tiene un papel fundamental en el desarrollo de la alergia y la inflamación <sup>(442, 443)</sup>.

Se ha demostrado que las concentraciones de TSLP y de TNF $\alpha$  están elevadas en el líquido sinovial de los pacientes con AR y que el TNF $\alpha$  estimula la producción de



la TSLP por los fibroblastos sinoviales <sup>(444)</sup>. Es posible que la producción de TSLP inducida por el TNF $\alpha$  en los fibroblastos sinoviales, pueda regular la activación de las células dendríticas en la AR <sup>(445)</sup>. En modelos animales de artritis experimental dependiente del TNF $\alpha$  se ha observado que el bloqueo de la TSLP mejora la actividad de la artritis <sup>(446)</sup>.

Estos datos en su conjunto sugieren que la TSLP esta involucrada no solo en la patogenia de la alergia y la inflamación en general, si no también en patogenia de la artritis reumatoide.

En nuestro estudio hemos observado que el SNP rs17132762 situado a 4,2 kb de este gen está asociado con la respuesta EULAR ( $P= 4,52E-04$ , OR=0,12) lo que aporta nuevos datos sobre la posible implicación funcional entre la TSLP y la artritis reumatoide.

### ***PIK3CG (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, catalytic subunit gamma)***

Este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de las pi3/pi4-quinasas. El producto de este gen es una enzima que fosforila el grupo 3-hidroxilo del anillo de inositol. Es un importante modulador de la adhesión celular, de la señalización mediada por la E-cadherina y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los epitelios. Además de su papel en la formación de las uniones adherentes, esta proteína desempeña un papel fundamental en la regulación de la citotoxicidad mediada por las células NK <sup>(447, 448)</sup>.

El alto grado de complejidad y plasticidad de la transducción intracelular de las señales es a menudo considerado como un impedimento a *priori* para el éxito de las terapias dirigidas. Sin embargo, el estudio de las vías de transducción de señales que subyacen en los procesos de las enfermedades y el conocimiento de los componentes de señalización y sus interacciones, ha favorecido el desarrollo de medicamentos eficaces y seguros que se dirigen específicamente a los elementos cruciales de la señalización intracelular <sup>(447, 448)</sup>.

En este sentido, la PI3K (*phosphoinositide 3-quinasa*), ha sido considerada como una diana terapéutica para el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes, así como para el tratamiento del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares. Pero la falta de especificidad y selectividad de sus isoformas, así como el bajo perfil biológico de los inhibidores de PI3K han obstaculizado su desarrollo.

En relación a la artritis reumatoide, se han realizado diversos estudios en modelos animales de artritis donde se han ensayado pequeñas moléculas inhibitoras de PI3K (i.e. Pik3cg). Camps et al observaron que la administración oral de un inhibidor de PI3K suprime la inflamación y la progresión del daño articular en modelos animales de artritis <sup>(449)</sup>.

El PI3K tiene un papel crucial y específico en múltiples etapas del desarrollo de la AR ya sea en la vía de presentación del antígeno o en la señalización de recepto-

res de citoquinas y quimioquinas en las células cebadas, macrófagos, neutrófilos y sinoviocitos <sup>(447)</sup>.

En nuestro estudio hemos observado una asociación entre el SNP rs4727661 situado a 23,4kb del gen *PIK3CG* ( $P=2,04E-04$ , OR=1,95) y la respuesta al tratamiento antiTNF $\alpha$  determinada por la respuesta EULAR.

### **CYP7B1 (cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1)**

El gen *CYP7B1* codifica una enzima que cataliza la conversión de la dehidroepiandrosterona (DHEA o *Dehydroepiandrosterone*) en 7  $\alpha$ -hidroxi-DHEA (7 $\alpha$ -OH-DHEA). Este metabolito tiene un efecto activador de la respuesta inmune.

Hasta la fecha, se conocen 3 isoenzimas del citocromo P450 7-hidroxilasa, la CYP7A, la CYP39A1 y la CYP7B. La CYP7A se expresa en el hígado y la CYP39A1 se expresa en el cerebro y ambas están involucradas en el metabolismo del colesterol. La CYP7B se expresa en los tejidos involucrados en la esteroidogénesis (i.e. ovario y testículos) y en los tejidos y células del sistema inmune (i.e. timo y linfocitos) <sup>(450)</sup>.

En modelos animales de artritis se ha observado que la gravedad de la artritis se correlaciona con la expresión del gen CYP7B. Además, se ha demostrado que la 7-OH-DHEA previene in vitro los efectos inmunosupresores de los glucocorticosteroides <sup>(451)</sup>.

Dulos et al <sup>(452)</sup>, publicaron un estudio donde se analizaba la expresión de la 7-OH-DHEA en muestras sinoviales de pacientes con AR y la regulación de la actividad de la CYP7B en fibroblastos sinoviales. En este estudio se observó que determinadas citoquinas (i.e. TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-17) aumentaban la actividad de la CYP7B en el tejido sinovial y que este aumento producía una elevación del metabolito de 7-OH-DHEA en el líquido sinovial, lo que podía contribuir a la perpetuación de la inflamación.

En nuestro estudio hemos observado que el SNP rs65786716 situado a 75,4 kb del gen *CYP7B*, está asociado con la respuesta EULAR ( $P=3,75E-04$ , OR=0,52).

### **PTK2B (PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta)**

El gen *PTK2B* también conocido con el nombre de *PYK2* codifica una quinasa de adhesión focal. Las quinasas de adhesión focal o FAK (*focal adhesion kinase*) incluyen la PYK2 (*proline-rich kinase 2*) y son los principales mediadores de la vía de señalización de la integrina  $\alpha v \beta 3$  que tiene un papel importante en la adhesión celular, la regulación de los osteoclastos y la angiogénesis, todos ellos procesos muy importantes en la patogenia de la AR <sup>(453, 454)</sup>. Shahrara et al. identificaron una expresión diferencial de determinadas FAK quinasas (i.e. PYK2) en el tejido sinovial de pacientes con AR en comparación con el tejido sinovial procedente de

pacientes con artrosis y de sujetos control.

El gen *PYK2* fue estudiado inicialmente en otra enfermedad autoinmune, el lupus eritematoso sistémico. Wang et al <sup>(455)</sup> analizaron la expresión y la activación de la *PYK2* en células mononucleares de sangre periférica de 36 pacientes con LES y se evaluó si la activación de la *PYK2* estaba correlacionada con la actividad y el daño orgánico en el LES. Se analizaron además muestras de 19 pacientes con AR y de 15 sujetos control. En este estudio se observó un aumento significativo tanto en la concentración de la proteína total *PYK2* como de su forma activada/fosforilada en sangre periférica en pacientes con LES, particularmente en aquellos pacientes con nefritis lúpica de clase IV, en comparación con pacientes con AR y controles. Se observó una correlación clara entre la activación de *PYK2* y la concentración del complemento en el suero. Esto sugiere que la *PYK2* podría tener un papel importante en la etiopatogenia del LES.

En nuestro estudio el SNP rs11783759 situado en el sexto intrón del gen *PTK2B* estaba asociado a la respuesta EULAR ( $P= 3,97E-04$ , OR= 1,83).

### ***DLG5 (discs, large homolog 5 (Drosophila))***

El gen *DLG5* codifica la enzima MAGUK (*membrane associated guanylate kinase*). Existen evidencias de que esta enzima participa en el mantenimiento de la integridad y la polaridad de las células y sobre todo en el mantenimiento de la estructura epitelial <sup>(456)</sup>. En consecuencia se ha postulado que determinadas variaciones en el gen *DLG5* pueden alterar la función normal de la barrera epitelial, por ejemplo en el tracto gastrointestinal, por lo que determinados sujetos podrían ser más vulnerables a la infección y al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal <sup>(457, 458)</sup>.

Kek et al <sup>(458)</sup>, observaron una asociación significativa entre polimorfismos del gen *DLG5* y el desarrollo de la enfermedad de Crohn (EC) en un grupo de pacientes de origen asiático. El genotipo C/C del polimorfismo 4136 C/A del gen *DLG5* estaba significativamente asociado a la EC ( $P=2,3E-03$ , OR= 2,53), mientras que el genotipo A/A estaba asociado de forma más significativa con el grupo control ( $P=2,2E-02$ , OR=0,44). Estos resultados coinciden con los observados por Weersma et al. en un estudio realizado en pacientes con EC de origen alemán <sup>(459)</sup>.

El gen *DLG5* se ha asociado con la susceptibilidad de desarrollar enfermedad de Crohn, sin embargo en la actualidad no existen evidencias de asociación con la susceptibilidad de desarrollar AR. No obstante, como hemos comentado en el apartado de la introducción, la AR tiene un componente genético compartido en algunas variantes con otras enfermedades autoinmunes donde el TNF $\alpha$  tiene un papel relevante, como son la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, por lo que no es de descartar que este gen pueda estar involucrado en la fisiopatología de la AR y la variabilidad en la respuesta al tratamiento.

En nuestro estudio hemos identificado una asociación entre el SNP rs11002285 situado a 24,2 kb del gen *DLG5* ( $P=3,67E-04$ , OR= 3,14 ) y la respuesta EULAR al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

### ***ETS1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1)***

Otro de los polimorfismos asociados a la respuesta EULAR es el SNP rs7926975 en el noveno intrón del gen *ETS1* ( $P=4,61E-04$ , OR=2,33). Este gen codifica a un factor de transcripción de la familia ETS. Estas proteínas funcionan como activadores o represores transcripcionales de numerosos genes que están implicados en la senescencia y muerte celular, en la migración celular y en la génesis tumoral. Numerosos estudios han demostrado que estas proteínas tienen un papel importante en la diferenciación de los osteoblastos y en el desarrollo óseo. Además se ha observado que el gen *ETS1* está involucrado en la regulación de las proteasas extracelulares como las MMP <sup>(460, 461)</sup>.

El factor de transcripción ETS1 ha estado íntimamente ligado a la regulación de la angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como asociado a procesos patológicos y su expresión en las células endoteliales está regulada por el factor de crecimiento vascular endotelial, el factor angiogénico más importante en la AR <sup>(462)</sup>.

Wernert et al <sup>(462)</sup> investigaron la expresión del gen *ETS1* en tejido sinovial de pacientes con AR activa y compararon los resultados con los datos obtenidos en pacientes con artrosis, enfermedad que se caracteriza por presentar menor angiogénesis que la AR. En este estudio se proporcionaron datos que sugieren que el factor de transcripción ETS1 tiene un papel importante en la regulación de la angiogénesis en la AR. En otro estudio publicado por el mismo autor, se observó que tanto el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) como el TNF $\alpha$ , que son importantes factores angiogénicos en la AR, inducen la producción de ETS1 en cultivos de células endoteliales <sup>(463)</sup>. Por otra parte, se conoce que el ETS1 regula la producción de la colagenasa 1 y del plasminógeno de tipo uroquinasa activador <sup>(464)</sup>, que son necesarios para la degradación de la matriz durante las primeras fases de la germinación angiogénica <sup>(465)</sup>. Este mecanismo también se ha observado en la angiogénesis inflamatoria en la AR <sup>(466)</sup>.

### ***CD44 (CD44 molecule)***

La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de superficie celular que se expresa en un elevado número de células y tiene un papel importante en la interacción celular, la adhesión y la migración. Además participa en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la activación linfocitaria, la regulación de las células dendríticas y la hematopoyesis, entre otras. Esta proteína actúa también como receptor del ácido hialurónico (HA) y a su vez puede interactuar con otros ligandos, tales como la osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz <sup>(467)</sup>.

Existen múltiples evidencias que implican a la molécula CD44 en la patogénesis de la AR. Grisar et al<sup>(460)</sup>, estudiaron la expresión de diversas variantes de splicing del gen CD44 en monocitos circulantes y en tejido sinovial de pacientes con AR y artrosis. Estos autores observaron que la expresión de estas variantes estaba aumentada en el revestimiento sinovial de pacientes con AR en comparación con los pacientes con artrosis. Así mismos se observó una asociación inversa entre la expresión de Cd44v3 en monocitos de sangre periférica y el desarrollo de formas más agresivas de AR.

En un estudio posterior se ha observado que los anticuerpos anti-CD44, inyectados pasivamente en ratones DBA/1 con artritis inducida por colágeno, en ratones NOD con diabetes tipo 1 y en ratones SJL/j con encefalomiелitis autoinmune, reducen las manifestaciones clínicas de estas enfermedades. Aunque no se conoce el mecanismo de acción, los autores proponen que su efecto terapéutico puede ser debido a una atenuación de la migración de células inflamatorias y/o a la apoptosis de las mismas. No obstante la delección genética de CD44 en modelos de ratones *knockout* aumenta el desarrollo de artritis inducida, debido a la redundancia molecular mediada por RHAMM (*a receptor of hyaluronan-mediated motility*)<sup>(469)</sup>.

En nuestro estudio hemos observado que la presencia del SNP rs4756196 en el primer intrón del gen CD44 está asociado a la respuesta ( $P=4,74E-04$ ,  $OR=0,54$ ).

### **MAP2K2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2)**

Este gen codifica una proteína que es una quinasa específica dual, que pertenece a la familia de las MAP2K (*MAP kinase kinase family*), y que tiene un papel importante en la transducción de las señales de los factores de crecimiento mitógenos. Es capaz de fosforilar y activar a los complejos MAPK1/ERK2 y MAPK2/ERK3. La activación de esta quinasa es dependiente de la fosforilación de *Ser/Thr* por la MAP3K (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*).

La cascada MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) es el mayor sistema de señalización intracelular y está compartida por varios tipos celulares. En células de mamíferos, existen al menos tres subtipos de MAPK: ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), MAPK p38 y JNK (*c-jun amino-terminal kinase*)<sup>(440, 471)</sup>.

Existen numerosas evidencias que implican de forma robusta a las MAPK en la patogenia de la AR y en su tratamiento<sup>(472, 473, 474)</sup> que no son objeto de discusión en este proyecto. Sin embargo es preciso constatar que no se ha identificado ningún estudio que relacione al gen o la proteína codificada por *MAP2K2* con la artritis reumatoide.

En nuestro estudio se ha identificado un SNP, el rs350897, situado en el gen *MAP2K2* asociado de forma significativa con el  $\Delta$ DAS28 ( $P=3,85E-04$ ,  $OR=0,65$ ).

## **Genes con SNPs no sinónimos asociados en el GWAS**

### ***CRIP (cystein-rich intestinal protein)***

El gen *CRIP* (también denominado *CRIP2*) codifica un *putative* factor de transcripción dependiente del zinc, cuyas funciones son poco conocidas. Se expresa en células neuronales, células del músculo liso y en determinadas células tumorales. Por ejemplo se ha descrito una relación entre la expresión de CRIP y una menor progresión de las metástasis en el osteosarcoma<sup>(475)</sup> y se ha relacionado también con la apoptosis en el carcinoma de esófago<sup>(476)</sup>. También se ha descrito que CRIP2 participa en la remodelación del citoesqueleto y en la diferenciación de las células del músculo liso.

Quizás los datos más interesantes que puedan tener relación con el proceso inflamatorio derivan de un estudio publicado por Cheung et al. donde se observa que CRIP2 actúa como un factor de transcripción que inhibe la regulación de la angiogénesis mediada por citoquinas a través de la represión del NF- $\kappa$ B, por tanto podría inhibir funcionalmente la formación tumoral y la angiogénesis<sup>(477)</sup>.

Es interesante citar que recientemente se ha publicado un estudio de expresión génica a escala genómica realizado en cultivos de queratinocitos humanos con el objetivo de investigar el efecto de la radiación presente en las tecnologías *wireless*. En este estudio se observó que la expresión de determinados genes, entre los que se incluía CRIP2, estaba aumentada de forma significativa tras la exposición<sup>(478)</sup>.

En nuestro estudio hemos identificado una asociación entre el SNP rs7824 ubicado en el tercer exón de este gen y la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Se trata de un SNP no sinónimo que produce un cambio de aminoácidos de cisteína (*Cys*, aminoácido no polar) a serina (*Ser*, aminoácido polar) en la proteína resultante. En el presente proyecto aportamos la primera evidencia de una relación entre el gen CRIP2 y la AR. A pesar de los pocos datos que existen al respecto el valor de la asociación altamente significativo en población española y el hecho de que se trata de una variación que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, convierte a CRIP2 en un claro candidato para evaluar en posteriores estudios de validación funcional.

### ***CCDC125 (coiled-coil domain containing 125)***

En nuestro estudio se ha identificado una asociación entre el SNP rs10471774 situado en el primer exón del gen *CCDC125* ( $P=1,68E-04$ , OR=0,65) y la respuesta determinada por el  $\Delta$ DAS28.

Existen evidencias que sugieren que el gen *CCDC125* actúa como un regulador de la motilidad celular a través de los miembros de la familia RhoGTPase, que incluye RhoA (*Ras homolog gene family, member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*). Estas proteínas tienen un papel importante en la regulación y coordinación del citoesqueleto de

actina, necesario para la motilidad celular, y por tanto directamente implicadas en muchos procesos fisiológicos, tales como la morfogénesis embrionaria, la cicatrización de heridas, el tránsito de células inmunes, la contracción muscular y el desarrollo de la red neuronal. Las mutaciones en este gen se han asociado con una amplia variedad de enfermedades tales como las distrofias musculares, las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y la progeria <sup>(479, 480)</sup>.

Existen algunos datos que indican una elevada expresión del gen *CCDC125* en tejidos asociados con el sistema inmune como el timo, el bazo y la médula ósea <sup>(480)</sup>.

En nuestro estudio hemos observado que el polimorfismo asociado a la respuesta, el SNP rs10471774, se sitúa en un exón y condiciona un cambio de una valina (*Val*, aminoácido no polar) a una metionina (*Met*, aminoácido no polar) en la proteína resultante.

### ***ANKRD34B (ankyrin repeat domain 34B)***

Este gen (también conocido como *cytosolic phosphoprotein DP58*) codifica una proteína citosólica involucrada en la diferenciación de células dendríticas en la médula ósea <sup>(481)</sup>. Existe muy poca información en la literatura a cerca de este gen y su proteína.

En el presente proyecto el SNP rs32857 no sinónimo situado en el quinto exón del gen ANKRD34B produce un cambio del aminoácido leucina (*Leu*, aminoácido no polar) a serina (*Ser*, aminoácido polar) en la proteína codificada y esta variación genética está asociada a la respuesta EULAR con el tratamiento anti-TNF $\alpha$  ( $P=9,68E-06$ ,  $OR=2,56$ ).

### ***TRIM25 (tripartite motif containing 25)***

El TRIM25 (*Tripartite motif-containing 25*) también conocido como EFP (*Estrogen-responsive Finger Protein*), es un miembro de la familia TRIM. Esta familia está constituida por un número variable de miembros que puede variar entre especies, y en la especie humana se han identificado más de 60 miembros. La familia TRIM, es a su vez una de las subfamilias de la familia RING (*finger E3 ubiquitin ligase*) que está implicada en una gran variedad de funciones celulares incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la oncogénesis y la apoptosis <sup>(482,483)</sup>. No existen datos publicados en relación a una posible relación entre este gen y la artritis.

En nuestro estudio hemos identificado una asociación entre el SNP rs205498, no sinónimo, situado en el cuarto exón del gen *TRIM25* y la respuesta EULAR ( $P=5,31E-06$ ,  $OR=2,37$ ). Este SNP origina un cambio del aminoácido prolina (*Pro*, aminoácido no polar) a leucina (*Leu*, aminoácido no polar) en la proteína resultante.

#### 4.2.4.- Replicación de nuevos *loci* candidatos: estudio del poder estadístico

Los resultados del presente proyecto proporcionan un listado de *loci* asociados a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en la artritis reumatoide, alguno de ellos funcionalmente atractivos porque ya se han descrito asociados a la patogenia de la AR y otros con una significancia puramente estadística (i.e. *loci* comúnmente asociados a respuesta  $\Delta$ DAS28 y EULAR). En cualquier estudio genético es fundamental realizar la validación de los resultados en una muestra independiente a fin de separar las verdaderas asociaciones de los falsos positivos. Como se observó en el apartado de resultados, la estimación del poder estadístico de replicación de la asociación de cada uno de nuestros SNPs candidatos nos ha permitido evaluar el tamaño muestral más adecuado para este objetivo.

El poder estadístico es la probabilidad de, siendo verdadera la asociación, que la prueba estadística alcance una significación igual o superior a un umbral definido, es decir  $\alpha = 0,05$  ó  $\alpha = 0,01$ . Por tanto, un 80% de poder a nivel de 0,05 indica que se detectará una asociación verdadera con una probabilidad del 80%, o lo que es equivalente, en 4 de 5 muestras de tamaño similar extraídas de la misma población. El poder estadístico está directamente relacionado con el tamaño muestral y el tamaño del efecto genético (i.e. Odds Ratio). Se reconoce que, en general, un estudio de asociación genético debería ser llevado a cabo sólo si se estima un poder estadístico superior al 80% <sup>(484)</sup>.

En nuestro estudio hemos calculado el poder de replicación de los SNPs y *loci* pre-seleccionados con dos tamaños muestrales, tal y como se observa en la tabla 38 del apartado de resultados. Con una muestra de 267 pacientes 17 asociaciones alcanzaron un poder de replicación de más del 80%. Sin embargo, si doblamos el número de pacientes para replicación (534 pacientes), el número de asociaciones para las que se tiene suficiente poder estadístico prácticamente también se duplica. Este resultado refleja claramente la importancia del tamaño muestral en los estudios de replicación.

Es por este motivo que en el presente proyecto de tesis no hemos llevado a cabo el estudio de replicación y se ha decidido postergar para un futuro proyecto con un tamaño muestral más adecuado. Nuestro objetivo es, partiendo de los 267 pacientes hasta ahora disponibles y no incluidos en el estudio de GWAS, obtener un grupo de 534 pacientes de las mismas características de las que se han incluido en el PSE "IMID Kit". Con este tamaño muestral se alcanzará un poder de replicación del mas del 80% en 36 SNPs de los 50 SNPs candidatos seleccionados en el presente proyecto.

#### 4.2.5.- Análisis de vías biológicas asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

El estudio de asociación de vías genética mediante la aproximación GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$  fue utilizada por primera por Krintel et al <sup>(270)</sup>. En este estudio se utilizaron los valores de significación



estadística de todo el genoma para identificar aquellas vías o grupos de genes que estaban sobre representados en el conjunto de *loci* más significativos respecto al grupo de *loci* menos significativos.

El programa utilizado para este análisis fue el *software GenGen* comentado anteriormente en el apartado de la metodología. En el presente proyecto hemos utilizado como criterio de selección de las vías asociadas al  $\Delta$ DAS28 y a la respuesta EULAR, el valor nominal de la  $P < 0,05$ . En nuestro estudio además hemos realizado la corrección con el índice DAS28 a la semana basal en el análisis realizado en relación la variable  $\Delta$ DAS28.

En nuestro estudio hemos identificado 28 vías glénicas asociadas significativamente a la respuesta a anti-TNF $\alpha$  en pacientes con AR. Al igual que en el estudio de Krintel et al varias vías estaban asociadas a la inflamación y a la respuesta inmune. En el estudio de Krintel et al <sup>(270)</sup>, una de las vías asociadas con el  $\Delta$ DAS28 fue la **vía de la IL2RA** que es un gen asociado con la susceptibilidad de desarrollar AR observado en estudios anteriores <sup>(299,485)</sup>. Coincidiendo con este trabajo, en el presente proyecto también hemos identificado la vía de señalización de la IL-2 asociada a la respuesta al tratamiento, pero a diferencia del estudio de Krintel et al en nuestro trabajo la asociación se ha objetivado con la respuesta EULAR.

La IL-2 tiene un papel clave en la activación de las células T que dependen de esta citoquina para su proliferación y sus funciones efectoras. Los efectos de la IL-2 están mediados a través de la interacción con el receptor transmembrana específico (IL-2R). La unión de la IL-2 con el IL-2R provoca la activación de varias tirosin quinasas, incluyendo Src-quininas, las quinasas Jak y la *sypp72<sup>sypp</sup>*. La IL-2 también participa en la apoptosis programada de los linfocitos T <sup>(486, 487)</sup>.

La **vía de señalización mTOR** (*mammalian target of rapamycin*) también está incluida entre las vías asociadas significativamente en el estudio de Krintel et al. En nuestro estudio también se ha replicado esta asociación con la respuesta EULAR con un valor de significación de  $P = 4E-03$ . El mTOR es una proteína quinasa serina/ treonina que regula diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, la proliferación, la motilidad, la supervivencia y la síntesis y transcripción de proteínas. <sup>(488, 489)</sup>

Esta vía está desregulada en muchas enfermedades y desempeña un papel importante en la regulación de las propiedades invasivas de los fibroblastos sinoviales en pacientes con RA. La vía de señalización mTOR por lo tanto podría ser clave en la respuesta clínica al tratamiento anti-TNF $\alpha$  <sup>(490)</sup>.

En nuestro estudio además hemos identificado otras vías adicionales asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Entre estas vías, la vía con una marcada significación estadística ( $P < 1E-04$ ) es la **vía del inflamósoma NLRP3** anteriormente comentada. Este resultado implica que otros genes de la vía a parte del NLRP3 están sobrerrepresentados en el grupo más significativo de SNPs. Estos genes son: *APP* (*amyloid beta (A4) precursor protein*), *PANX1* (*pannexin 1*) y *TXNIP* (*thioredoxin interacting protein*). Este resultado aumenta en gran medida la evidencia en torno a

la implicación de esta vía en la respuesta diferencial al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . La vía del inflamosoma está asociada a la patogenia de determinadas enfermedades inflamatorias el como vitíligo (i.e. mutación en el gen *NPL1*), el síndrome *Muckle-Wells* (i.e. mutación en el gen *NPL3*), la enfermedad de Crohn, o la gota, entre otras. El tratamiento de los pacientes con algunas de estas enfermedades con antagonistas del receptor de la IL-1 revierte los síntomas clínicos, sugiriendo una relación causa efecto entre la producción de IL-1 $\beta$  y la enfermedad <sup>(491,492)</sup>

Algunos miembros de esta familia forman complejos de multiproteínas o inflamosomas, que regulan el procesamiento y la secreción de mediadores proinflamatorios, tales como la IL-1 $\beta$  y la IL-18. La actividad del inflamosoma se activa no sólo por la infección microbiana, sino también por una amplia gama de estímulos no infecciosos exógenos y endógenos. Por consiguiente, la desregulación de la actividad del inflamosoma se asocia con numerosas enfermedades inflamatorias, no microbianas. El descubrimiento de polimorfismos en el gen *NLRP3* en las enfermedades autoinflamatorias, tales como el síndrome de *Muckle-Wells* ha llevado a la asociación de las proteínas NLRs con la patogénesis de muchas enfermedades no microbianas que incluyen la AR, los trastornos neurodegenerativos, trastornos metabólicos (i.e. obesidad y la diabetes), enfermedades cardiovasculares (i.e. aterosclerosis e infarto de miocardio), enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad renal y dermatitis por hipersensibilidad <sup>(493)</sup>. Sin embargo, el papel del inflamosoma en la enfermedad autoinmune es menos claro que en las enfermedades autoinflamatorias, a pesar de los numerosos efectos de la IL-1 $\beta$  y IL-18 que puede tener en la inmunidad adaptativa <sup>(494)</sup>.

La evidencia que vincula el inflamosoma y la patogénesis de la AR está sustentada principalmente por la moderada efectividad demostrada por el Anakinra <sup>®</sup> que como comentamos anteriormente en el apartado de la introducción es un inhibidor de la IL-1. No obstante el bloqueo del inflamosoma que consiste en el bloqueo de la IL-1 y la IL18 probablemente sea más efectivo que el bloqueo selectivo de la IL-1. Otra evidencia está sustentada por un estudio que ha observado una relación entre la presencia de dos polimorfismos en los genes *NLRP3* y *CARD8* que causan un aumento de la producción de IL-1 $\beta$  y un aumento de la susceptibilidad y la gravedad de la AR <sup>(412)</sup>. Sin embargo en otro estudio realizado por el mismo grupo que analizó el polimorfismo en el gen *NLRP3* exclusivamente no observó asociación con la susceptibilidad de desarrollar la AR ni con la incidencia o severidad de la AR <sup>(495)</sup>. Además, en otro estudio no se observaron diferencias significativas entre la expresión del NLRP3 y la extensión de la inflamación sinovial en pacientes con AR y en pacientes con artrosis <sup>(496)</sup>. No obstante, estos estudios no descartan la posibilidad de que el inflamosoma NLRP3 tenga un papel funcional en la AR, tanto en la iniciación como en el mantenimiento de la inflamación. Los pacientes con una excesiva activación de NLRP3 con frecuencia desarrollan dolor e inflamación articular, lo que sugiere de nuevo la implicación del inflamosoma en la patogénesis de la AR <sup>(497)</sup>.

### 4.3.- Estudios de replicación de *loci* publicados asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$

#### 4.3.1.- Validación de SNPs identificados en GWAS previos

##### GWAS publicado por Liu et al

Liu et al <sup>(324)</sup> identificaron en un GWAS donde se incluyeron 89 pacientes con AR, 16 SNPs significativamente asociados con el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Estos 16 SNPs presentaban un efecto importante con un OR de más de 3,5 entre el grupo de pacientes respondedores y no respondedores, inclusive algunos SNPs mostraron un OR de más de 10. Considerando el pequeño tamaño muestral de este estudio, la posibilidad de identificar asociaciones falsamente positivas era considerable, por lo que es fundamental la validación de estos resultados en cohortes más importantes.

El poder calculado para realizar la replicación de estos resultados en nuestra muestra en base a las estimaciones originales del efecto genético fue de más del 90%. Sin embargo no se han podido replicar estos resultados lo que sugiere que son resultados falsos positivos. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que, dado el bajo tamaño muestral del GWAS de Liu et al, se sobreestimara el efecto genético. Si el efecto real fuera mucho menor (i.e. OR < 1,2), es posible que el poder de replicación de nuestra cohorte fuera inferior al 80%. En este sentido, se ha comprobado que la estimación del efecto genético de muchos *loci* identificados mediante GWAS suele ser inferior en los estudios de replicación sucesivos. Este efecto se conoce como la maldición del ganador (i.e. *winner's curse*) y está ampliamente aceptado en este tipo de estudios <sup>(498)</sup>. Otro motivo que también podría explicar la falta de replicación podría ser la presencia de diferencias fenotípicas entre ambas cohortes. La presencia de heterogeneidad clínica en una enfermedad compleja como la AR puede fácilmente generar diferencias entre las distintas cohortes a estudio y por tanto, reducir la probabilidad de replicar la asociación original.

Al analizar si existe una heterogeneidad clínica entre la muestra incluida en el estudio de Liu et al <sup>(324)</sup> y la incluida en el presente proyecto, observamos que si existen realmente diferencias, sobre todo en cuanto a la edad de los pacientes al inicio del tratamiento anti-TNF $\alpha$ , los años de evolución de la AR y el hábito tabáquico registrado en ambos estudios. En nuestro estudio además hemos utilizado diferentes criterios de valoración de la respuesta y se agrupó a los pacientes buenos y moderados respondedores. En cambio Liu et al compraron a los buenos y malos respondedores excluyendo a los moderados respondedores del estudio.

Sin embargo nuestros resultados coinciden con otros estudios diseñados específicamente con el fin de replicar los resultados publicados por este grupo. Suarez et al <sup>(326)</sup> publicaron un estudio que analizaba los 16 SNPs candidatos de Liu et al en 151 pacientes españoles utilizando como en el estudio original la asociación de estos SNPs con respecto al *re/DAS28* y a la respuesta EULAR. En este estudio tampoco se pudieron identificar ninguna de las 16 asociaciones previamente publicadas.

El segundo intento de validar estos resultados fue un relación a un estudio de GWAS publicado por Krintel et al <sup>(270)</sup>. En este estudio tampoco se pudo replicar la asociación de estos 16 SNPs con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

### **GWAS publicado por Plant et al**

Un nuevo intento de realizar un estudio de asociación genética a escala genómica con la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  se realizó en el año 2010 por Plant et al <sup>(325)</sup>. En este estudio se identificaron 7 SNPs asociados con la respuesta a los 6 meses de iniciado el tratamiento. Se incluyeron un total de 1.286 pacientes con AR utilizando un diseño de tres fases. Los SNPs identificados en la fase I asociados al  $\Delta$ DAS28 fueron replicados en una muestra independiente de 379 pacientes en la fase II. Los SNPs identificados en las fases I y II fueron analizados en un meta-análisis y los SNPs resultantes fueron genotipados en una tercera muestra de 341 pacientes. Los SNPs identificados como asociados al  $\Delta$ DAS28 en las tres fases fueron agrupados en un segundo meta-análisis resultando una lista de 7 SNPs candidatos. Es interesante objetivar que ninguno de estos 7 SNPs fue replicado significativamente en la fase III, incluso ni de forma nominal ( $P > 5E-02$ ). Combinando las tres fases en un posterior meta-análisis tampoco se llegó a la significación estadística a escala genómica (el valor máximo alcanzado fue de  $P = 5E-05$ ). A pesar de que este estudio representa la mayor cohorte publicada hasta el momento sobre asociación genética y respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ , tienen ciertas limitaciones metodológicas como el uso de un punto de corte de significación estadística poco exigente permitiendo la presencia de falsos positivos.

En nuestra cohorte ninguno de estos 7 SNPs alcanzó una asociación estadística en relación al  $\Delta$ DAS28, aunque se debe considerar que en nuestro estudio la valoración de la respuesta se realizó a las 12 semanas de iniciado el tratamiento y en el estudio de Plant et al <sup>(325)</sup> fue realizada a los 6 meses del inicio del tratamiento. Como en la primera fase de descubrimiento no observamos una asociación estadísticamente significativa con ninguno de los SNPs candidatos se decidió no realizar el estudio de múltiples fases como en el estudio original. Además, las poblaciones de ambos estudios presentaban diferencias en relación a la edad de inicio del tratamiento, el hábito tabáquico, la duración de la enfermedad y el valor de la media del DAS28 a la semana basal que era más elevado en el estudio de Plant et al <sup>(325)</sup>.

Otro intento de replicación de los resultados de este estudio fue realizado por Krintel et al que incluyó una cohorte danesa de 196 pacientes con AR tratados con anti-TNF $\alpha$  <sup>(270)</sup>. En este estudio a pesar de utilizar el mismo diseño en múltiples fases que el estudio original tampoco se pudo confirmar la asociación con ninguno de estos SNPs. Esto puede explicarse por las diferencias entre las características de ambas poblaciones y el pequeño tamaño de la muestra del estudio de Krintel et al insuficiente para llevar a cabo un estudio de múltiples fases como el realizado por Plant et al.

## GWAS publicado por Krintel et al

Krintel et al<sup>(270)</sup> en el año 2012 han publicado un estudio de GWAS en población danesa. En este estudio, al igual que en el nuestro, ningún SNPs genotipado alcanzó la significación estadística a escala genómica. No obstante estos autores también han identificado asociaciones robustas con valores bajos de  $P$  en SNPs asociados con el  $\Delta$ DAS28, con el  $re$ /DAS28 y con la respuesta EULAR.

La población incluida en nuestro estudio es similar a la cohorte danesa en cuanto a la edad de inicio, la distribución por género, los años de evolución de la enfermedad y la proporción de pacientes fumadores activos. Pero existen algunas diferencias como por ejemplo la distribución de los pacientes en relación al tratamiento anti-TNF $\alpha$  utilizado, tal y como se observa en la tabla 47 de este apartado. Otra diferencia observada es en relación a la actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento. En nuestro estudio la actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento era alta a moderada, mientras que en el estudio danés era moderada a baja. También es importante aclarar que la medicación concomitante en nuestro estudio no se consideró entre las variables analizadas. En ambos estudios el parámetro utilizado para la valoración de la respuesta fue similar, así como el tiempo de valoración (12 semanas en nuestro estudio y 14 semanas en el estudio danés).

A pesar de las diferencias observadas entre los dos grupos de pacientes hemos identificado dos asociaciones significativas entre el SNP rs11045392 cercano al gen *PDE3A* del cromosoma 12 tanto en relación al  $\Delta$ DAS28 ( $P=4,28E-03$ ) como con la respuesta EULAR ( $P=2,25E-03$ , OR=1,70) y entre el SNP rs3794271 ubicado en el gen *SLCO1C1* del mismo cromosoma en relación al  $\Delta$ DAS28 ( $P=3,41E-03$ ) y la respuesta EULAR ( $P=2,96E-03$ , OR=1,68). Al realizar el análisis considerando solo a los buenos y malos respondedores la asociación entre ambos polimorfismos y la respuesta se presentó aun más robusta.

El presente proyecto independientemente de representar el cuarto GWAS en relación a la respuesta al tratamiento antiTNF $\alpha$  y el primero en población española, se constituye como el primer estudio de validación de loci candidatos asociados de forma robusta a la respuesta al tratamiento antiTNF $\alpha$  en pacientes con AR.

El gen *PDE3* (*Cyclic nucleotide PhosphoDiesterase 3*) codifica una de las isoformas de la fosfodiesterasa, específicamente la 3. Estas enzimas fosfodiesterasa hidrolizan los mensajeros secundarios intracelulares AMPc (*Adenosin monofosfato cíclico*) y GMPc (Guanosin monofosfato cíclico), inhibiendo su acción. Existe un amplio patrón de expresión, localización celular y afinidad por sustratos que la convierte en una diana terapéutica interesante para numerosas patologías como la AR<sup>(499, 500, 501)</sup>.

Yan et al<sup>(502)</sup> han demostrado que, en cultivos de cardiomiocitos, la baja regulación de *PDE3A* concomitante con la regulación del AMPc, se asoció con una mayor apoptosis del cardiomiocito. Otras *PDE* como la *PDE4* y la *PDE7* están más expresadas en el sistema inmune.

Se ha observado que determinados inhibidores de estas enzimas actúan sobre las

concentraciones de AMPc y producen efectos anti-inflamatorios como por ejemplo una disminución del TNF $\alpha$ . Aunque la PDE3 no es la fosfodiesterasa más ampliamente expresada en el sistema inmune, también ha sido detectada en algunas células inmunocompetentes. Esto hace más probable que el gen *PDE3A* pueda tener un determinado papel en la patogenia de la AR y más específicamente en relación al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  <sup>(503,504)</sup>.

El *SLCO1C1* (*solute carrier organic anion transporter family, member 1C1*) codifica un miembro de la familia de los transportadores de anión orgánico. La proteína codificada es un receptor transmembrana que media la captación de sodio-independiente de las hormonas tiroideas en los tejidos cerebrales. Esta proteína tiene una afinidad particularmente elevada para las hormonas tiroideas, como la tiroxina, triyodotironina inversa y triyodotironina. Se ha descrito que determinados polimorfismos en el gen que codifica esta proteína pueden estar asociados con la fatiga y la depresión en pacientes que sufren hipertiroidismo <sup>(505)</sup>. Es interesante además observar que otros miembros de la misma familia, situados en la misma región cromosómica, son transportadores de sustratos, incluyendo el MTX <sup>(506, 507, 508, 509)</sup>. Además la expresión hepática de ciertos genes *SLCO* está regulada por otras citoquinas como el anti-TNF $\alpha$  <sup>(510)</sup>.

Hasta la fecha, ninguno de estos dos genes ha sido asociado directamente ni con la AR ni con el tratamiento anti-TNF $\alpha$ . No obstante las funciones de estos genes, indican la necesidad de llevar a cabo estudios centrados en estos *loci* ya que son los primeros loci robustamente replicados en relación a la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en apacientes con AR.

#### 4.3.2.- Validación de SNPs identificados en estudios de asociación de gen candidato previos

En el presente proyecto también se ha llevado a cabo el estudio de replicación de *loci* previamente analizados en dos estudios de asociación que utilizaron la estrategia del gen candidato <sup>(230, 292)</sup>.

En el estudio de Cui et al <sup>(230)</sup> se analizaron 31 SNPs anteriormente asociados con la susceptibilidad de desarrollar AR y se incluyeron pacientes de 9 cohortes independientes con un total de 1.283 pacientes con AR.

El segundo estudio fue publicado por Potter et al <sup>(292)</sup> y se analizaron 199 SNPs en 24 genes candidatos involucrados con dos sistemas de señalización estrechamente involucradas con la inflamación y la respuesta inmunitaria, los TLR (*Toll-like receptor*) y la vía de señalización NF $\kappa$ B. Para este estudio se incluyeron 923 pacientes procedentes de la cohorte BRAGGSS (*Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate*).

### Estudio de asociación publicada por Cui et al

En relación al estudio de Cui et al <sup>(230)</sup> de los 31 SNPs analizados, un solo SNP (rs10919563) en el gen *PTPRC* (también conocido como *CD45*) estuvo asociado con la respuesta EULAR ( $P=1,0E-04$ , OR=0,55 en el análisis multivariante). Cuando se analizó la respuesta con respecto al  $\Delta$ DAS28 se observaron unos resultados similares ( $P=2,0E-04$ ). El alelo mayor (G) de este SNP asociado a la susceptibilidad de desarrollar la AR, también es predictor de una respuesta favorable al tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

Posteriormente Plant et al <sup>(290)</sup> incluyeron 1.115 pacientes de la cohorte BRAGGSS y analizaron 29 SNPs asociados a la susceptibilidad de desarrollar AR. Al igual que en el estudio de Cui et al <sup>(230)</sup> se observó una asociación entre el SNPs rs10919563 del gen *PTPRC* y la respuesta determinada tanto por el  $\Delta$ DAS28 ( $P=4E-02$ ) como por el criterio EULAR (buenos respondedores vs no respondedores) ( $P=3E-2$ ). Esta asociación no se pudo confirmar cuando se consideraba a los pacientes estratificados en base a los anticuerpos anti-CCP y según el tipo de tratamiento anti-TNF $\alpha$ . En este mismo artículo se observó una asociación con el SNPs rs11594656 ubicado en el gen *IL2RA* con respecto a la respuesta EULAR ( $P=2E-02$ ) y no con respecto al  $\Delta$ DAS28 ( $P=3,1E-01$ ).

En nuestro estudio ningún SNPs analizado por Cui et al, presentó una asociación estadísticamente significativa al  $\Delta$ DAS28 ó a la respuesta EULAR, incluyendo el SNP ubicado en el gen *PTPRC* anteriormente replicado por Plant et al. La asociación más robusta se observó entre el SNP rs6457617 ubicado en el gen *HLA-DR4* en el cromosoma 6 ( $P=3,91E-03$ ) y el  $\Delta$ DAS28, aunque esta asociación no se observó con respecto a la respuesta EULAR. Se han identificado otras asociaciones nominales como la asociación con el SNP rs2104286 ubicado en el gen *IL2RA* que alcanza un valor de  $P=2E-02$  en el análisis con respecto al  $\Delta$ DAS28 coincidiendo con la asociación encontrada para este SNP en el estudio de Plant et al (480) con la diferencia de que en este estudio la asociación fue con respecto a la respuesta EULAR.

Aunque en nuestro estudio no hemos replicado la asociación entre el gen *PTPRC* y la respuesta al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ , esto no descarta la existencia de una asociación ya que en nuestra muestra no se alcanza el poder suficiente para llevar a cabo la replicación de este gen en base al efecto genético originalmente descrito.

### Estudio de asociación publicados por Potter et al

El otro artículo comentado fue publicado por Potter et al, en relación al sistema de señalización del TLR y de la vía del NF $\kappa$ B <sup>(292)</sup>. En este estudio se analizaron 187 SNPs ubicados en 24 genes candidatos en 923 pacientes de la cohorte BRAGGSS y analizaron la presencia de estos SNPs con respecto al  $\Delta$ DAS28 y a la respuesta EULAR a los 6 meses de tratamiento. El umbral de significación utilizado en este estudio fue poco estricto debido a la naturaleza exploratoria del mismo por lo que

no se realizó la corrección de los valores de significación por test múltiples.

Los sistemas de señalización del TLRs y del sistema NF $\kappa$ B son fundamentales en la regulación de la inflamación y de la respuesta inmune. El TLRs detecta los antígenos exógenos y endógenos y las vías de señalización (i.e. NF $\kappa$ B) regulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias (i.e. TNF $\alpha$  y IL-1), quimioquinas y metaloproteinasas de matriz. En los últimos años se ha observado que estas vías de señalización desempeñan un papel importante en la inflamación y en los procesos destructivos que caracterizan a la AR <sup>(511,512)</sup>.

En este estudio se observó que 8 SNPs ubicados en 6 loci (*CHUK*, *IKBKB*, *MyD88*, *NFkBIA*, *TLR-2*, *TLR-4*) presentaban una asociación con el  $\Delta$ DAS28 ( $P < 5E-02$ ) y 4 de estos loci (*CHUK*, *IKBKB*, *MyD88*, *TLR-2*) más otros 5 loci adicionales (*IRAK-3*, *NFkB-2*, *NFkBIB*, *PTGS2*, *TLR-10/1/6*) también presentaban una evidencia de asociación con el  $\Delta$ DAS28 y/o la respuesta EULAR al tratamiento con anti-TNF $\alpha$ . En nuestro estudio ninguno de estos loci estaba asociado de forma significativa con el  $\Delta$ DAS28 o a la respuesta EULAR al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide.



---

## CONCLUSION

---

Las conclusiones del presente proyecto de tesis doctoral son:

1.- Se han identificado biomarcadores no genéticos asociados a la respuesta al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide. El nivel de estudios es un biomarcador epidemiológico asociado de forma significativa con la respuesta. El factor reumatoide y los anticuerpos anti-CCP son biomarcadores serológicos asociados de forma significativa con la respuesta a determinadas terapias anti-TNF $\alpha$ .

2.- Se han identificado biomarcadores no genéticos asociados a la remisión al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide. El DAS28 a la semana basal es un biomarcador clínico asociado de forma significativa con la remisión.

3.- Se ha identificado un nuevo grupo de biomarcadores genéticos (i.e. SNPs) asociados a la respuesta al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en pacientes con artritis reumatoide en población española.

4.- Se ha estimado el poder de replicación y el tamaño muestral necesario para el estudio de validación de los nuevos loci candidatos asociados a la respuesta al tratamiento con terapias anti-TNF $\alpha$  en la artritis reumatoide.

---

# AGRADECIMIENTOS

---



---

# ANEXO

---

**ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

<b>IMID Biobank</b>	Título: <b>Consentimiento Informado pacientes proyecto IMID-Kit</b>		Código: <b>AD-001-V01</b>
	Área aplicación: <b>Centros donantes IMID-Kit</b>		Nº página: <b>1 de 3</b>
Elaborado por: <b>Raül Tortosa</b> Fecha: <b>17-05-2007</b>	Revisado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>20-05-2007</b>	Aprobado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>01-06-2007</b>	
Documentos asociados:			
<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>			
Apellidos: .....			
Nombre: ..... Fecha:.....			
<b>DONACIÓN VOLUNTARIA DE SANGRE PERIFÉRICA PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA</b>			
<b>Finalidad del proyecto:</b>			
<p>Para un adecuado avance en la investigación biomédica sobre el estudio de las enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes es necesario estudiar muestras de ADN de individuos voluntarios para conocer cuál es la información genética de estos pacientes y las alteraciones que influyen en su desarrollo.</p> <p>El almacenamiento de estas muestras permitirá a los científicos disponer de muestras para investigar: 1) qué genes influyen en el desarrollo de los diferentes tipos de enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes o en la protección frente a las mismas en la población, 2) cómo están influenciadas por el entorno en el que vive el individuo, y 3) qué genes influyen en la eficacia/ resistencia a tratamientos específicos.</p> <p>Toda la información personal que se recopile o genere en el estudio quedará protegida de acuerdo con la legislación vigente.</p>			
<b>Descripción del proceso:</b>			
A) Se le informará sobre los objetivos del proyecto de investigación para el que se emplearán las muestras y se le responderá a las dudas que pueda plantear.			
B) Debe proporcionar las muestras y los datos de forma totalmente voluntaria.			
C) No percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo por las muestras y datos proporcionados y éstas no tendrán valor comercial.			
D) El no proporcionar su consentimiento, no tendrá ninguna consecuencia en su tratamiento clínico.			
E) Aparte de las muestras requeridas para su diagnóstico clínico, se le tomará un volumen adicional de sangre venosa mediante una punción en el brazo (la donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días). Se recogerá también un pequeño volumen de orina.			
F) Las muestras estarán codificadas de forma que la identidad del donante será anónima para los investigadores.			

**ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

<b>IMID Biobank</b>	Título: <b>Consentimiento Informado pacientes proyecto IMID-Kit</b>		Código: <b>AD-001-V01</b>
	Área aplicación: <b>Centros donantes IMID-Kit</b>		Nº página: <b>2 de 3</b>
Elaborado por: <b>Raül Tortosa</b> Fecha: <b>17-05-2007</b>	Revisado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>20-05-2007</b>	Aprobado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>01-06-2007</b>	
<b>Documentos asociados:</b>			
<p>G) La titularidad de la custodia de sus muestras será compartida por los investigadores responsables del proyecto "Desarrollo de un Kit diagnóstico para las enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes (IMID-Kit)" del Hospital Universitari Vall d'Hebron y el Banco Nacional de ADN de la Universidad de Salamanca.</p> <p>H) A partir de las muestras de sangre donadas, por una parte se aislarán las células contenidas en las mismas y se extraerán los ácidos nucleicos sobre los que se realizarán los análisis genéticos, y, por otra parte, se obtendrá plasma. En algunos casos se cultivarán células sanguíneas para generar una fuente inagotable de ADN de cada individuo sin necesidad de volver a extraer sangre. Los datos fenotípicos (p.ej. enzimas hepáticas, inmunoglobulina, colesterol, etc.) obtenidos del análisis del plasma se incorporarán al fichero de datos asociado a cada muestra. A partir de la muestra de orina donada se valorarán concentraciones de metabolitos.</p> <p>I) Los productos obtenidos de las muestras y los datos asociados a las mismas se archivarán y quedarán custodiados, por un periodo mínimo de cinco años, en las instalaciones del Hospital Universitari Vall d'Hebron, existiendo una réplica de las mismas en el Banco Nacional de ADN.</p> <p>J) Los productos obtenidos de las muestras y los datos asociados a las mismas podrán ser empleados posteriormente en estudios de Investigación sobre enfermedades inflamatorias de base autoinmune, nacionales o extranjeros, de acuerdo con la legislación vigente siempre que: 1) hayan sido considerados de interés científico por el comité del proyecto "Desarrollo de un Kit diagnóstico para las enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes (IMID-Kit)" del Hospital Universitari Vall d'Hebron, 2) que cumplan los requisitos establecidos por los comités externos del Banco Nacional de ADN, Científico y de Expertos Asesores en cuestiones Éticas, Económicas, Medio-ambientales, Jurídicas y Sociales 3) o cualquier otro Comité Ético de Investigación Clínica acreditado.</p> <p>K) Los análisis genéticos y fenotípicos realizados serán tratados estadísticamente, exclusivamente para fines de investigación biomédica de acuerdo a lo descrito anteriormente.</p> <p>M) La Dra. Sara Marsal, del Hospital Universitari Vall d'Hebron, el Dr. Alberto Orfao, Director Científico del Banco Nacional de ADN, responsables de la custodia de las muestras y datos asociados a las mismas garantizarán que la identidad del donante no sea accesible a los investigadores, cuando datos o muestras sean transferidas a un investigador dentro de ese centro o de otro centro.</p> <p>N) La información será almacenada en soporte informático. Los datos registrados serán tratados estadísticamente, de forma codificada, para los fines de investigación científica que se describieron anteriormente.</p> <p>O) En todo momento el donante tendrá acceso a los datos registrados, siempre que expresamente lo solicite.</p> <p>P) Para todo lo no previsto en este documento, se aplicará la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre) y cualquier otra que resultara aplicable.</p>			

## ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

<b>IMID Biobank</b>	Título: <b>Consentimiento Informado pacientes proyecto IMID-Kit</b>		Código: <b>AD-001-V01</b>
	Área aplicación: <b>Centros donantes IMID-Kit</b>		Nº página: <b>3 de 3</b>
Elaborado por: <b>Raül Tortosa</b> Fecha: <b>17-05-2007</b>	Revisado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>20-05-2007</b>	Aprobado por: <b>Sara Marsal</b> Fecha: <b>01-06-2007</b>	
Documentos asociados:			

---

**DECLARACIONES Y FIRMAS**

▪ **Declaración del donante:**  
He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado:

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Sobre el fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales (estudios genéticos, de salud pública o estadísticos, que cumplan todos los requisitos que exige la ley).
- Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores que trabajen con ellas.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas en el Hospital Universitari Vall d'Hebron y en el Banco Nacional de ADN de la Universidad de Salamanca.
- Que en cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras de sangre.
- Que tengo derecho de acceso a los datos personales asociados a mis muestras.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Accedo a que los médicos responsables de este estudio me contacten en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.

Sí  
 No

Nombre: ..... Firma: .....

▪ **Declaración del médico de que ha informado debidamente al donante.**

Nombre: ..... Firma: .....

---

**APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

Yo, ..... revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado, con fecha .....

Fecha de la revocación.....

Firma:



## ANEXO 2. CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO

PSE-IMID-Kit	Formulario Epidemiológico BNADN-IMID-Kit	Comisión Clínica																																																												
<p>Fecha de la extracción:     /     /     Extracción realizada por:</p> <p>Hora de la extracción:     Estado de ayuno (horas):</p> <p>1. Sexo     Hombre <input type="checkbox"/>     Mujer <input type="checkbox"/></p> <p>2. Fecha de nacimiento:     /     /     <b>Peso:</b></p> <p>3. <b>Altura:</b></p>																																																														
<p><b>ACTIVIDAD FISICA</b></p> <p>4. ¿Qué tipo de ejercicio implica su <b>trabajo o actividad habitual</b>?</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Sentado la mayor parte del tiempo</p> <p><input type="checkbox"/> 2. De pie la mayor parte de la jornada sin grandes desplazamientos o esfuerzos</p> <p><input type="checkbox"/> 3. Caminando, llevando algún peso, desplazamientos frecuentes</p> <p><input type="checkbox"/> 4. Trabajo pesado, tareas que requieren gran esfuerzo físico</p> <p>5. ¿Qué tipo de ejercicio físico hace en su <b>tiempo libre</b>?</p> <p><input type="checkbox"/> 1. No hago ejercicio. Mi tiempo libre lo ocupo casi completamente sedentario (leer, ver la televisión, ir al cine, etc.)</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Alguna actividad física o deportiva ocasional (caminar o pasear en bicicleta, jardinería, gimnasia suave, actividades recreativas de ligero esfuerzo, etc.)</p> <p><input type="checkbox"/> 3. Actividad física regular, varias veces al mes (tenis, correr, natación, ciclismo, juegos de equipo, etc.)</p> <p><input type="checkbox"/> 4. Entrenamiento físico varias veces a la semana</p>																																																														
<p><b>MEDIOS DE TRANSPORTE</b></p> <p>6. Seleccione cuál es su <b>medio habitual de transporte</b>:</p> <p><input type="checkbox"/> 1. Coche particular como conductor</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Coche particular como pasajero</p> <p><input type="checkbox"/> 3. Transporte público (autobús, metro...)</p> <p><input type="checkbox"/> 4. Andando</p> <p><input type="checkbox"/> 5. Bicicleta...</p> <p><input type="checkbox"/> 6. Moto</p>																																																														
<p><b>TRABAJO</b></p> <p>7. Indique su <b>situación laboral habitual</b></p> <p><input type="checkbox"/> 1. Parrado</p> <p><input type="checkbox"/> 2. Estudiante</p> <p><input type="checkbox"/> 3. Opositor</p>																																																														
<p>4. Ama de casa</p> <p>5. Trabajador autónomo</p> <p>6. Empresario (hasta 10 empleados)</p> <p>7. Empresario (de 10-50 empleados)</p> <p>8. Empresario (de 50-100 empleados)</p> <p>9. Empresario (más de 100 empleados)</p> <p>10. Trabajador por cuenta ajena</p> <p>11. Funcionario</p>																																																														
<p>8. Por favor, especifique lo mejor posible, cual es su <b>profesión</b>:</p> <p><b>HÁBITOS ALIMENTICIOS</b></p> <p>9. ¿Con que frecuencia <b>comió</b> usted la semana pasada los alimentos que figuran a continuación?</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>0 días</th> <th>1-2 días</th> <th>3-5 días</th> <th>6-7 días</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1. Fruta fresca</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2. Carne</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3. Pescado</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4. Pasta, arroz, patatas</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5. Pan, cereales</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6. Verdura</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7. Legumbres</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8. Embutidos</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9. Lácteos (leche, queso, yogur)</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10. Huevos</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11. Dulces (galletas, mermeladas...)</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>				0 días	1-2 días	3-5 días	6-7 días	1. Fruta fresca					2. Carne					3. Pescado					4. Pasta, arroz, patatas					5. Pan, cereales					6. Verdura					7. Legumbres					8. Embutidos					9. Lácteos (leche, queso, yogur)					10. Huevos					11. Dulces (galletas, mermeladas...)				
	0 días	1-2 días	3-5 días	6-7 días																																																										
1. Fruta fresca																																																														
2. Carne																																																														
3. Pescado																																																														
4. Pasta, arroz, patatas																																																														
5. Pan, cereales																																																														
6. Verdura																																																														
7. Legumbres																																																														
8. Embutidos																																																														
9. Lácteos (leche, queso, yogur)																																																														
10. Huevos																																																														
11. Dulces (galletas, mermeladas...)																																																														
<p>10. ¿Cuántas tazas de <b>café o té</b> toma normalmente al día? _____</p> <p><b>TABACO</b></p> <p>11. Actualmente, ¿usted fuma a diario, ocasionalmente o nunca?</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">Cigarrros</td> <td style="width: 33%;">Puros</td> <td style="width: 33%;">Pipa</td> </tr> <tr> <td>1. Diariamente <input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>2. Ocasionalmente <input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>3. Nunca <input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>			Cigarrros	Puros	Pipa	1. Diariamente <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2. Ocasionalmente <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3. Nunca <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																
Cigarrros	Puros	Pipa																																																												
1. Diariamente <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
2. Ocasionalmente <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
3. Nunca <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																																												
		AD-002-01																																																												
		1																																																												

## ANEXO 2. CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO

PSE-IMID-Kit	Formulario Epidemiológico BNADN-IMID-Kit	Comisión Clínica																		
<p><b>12.</b> ¿Qué tipo de tabaco y cantidad fuma usted cada día?</p> <p><input type="checkbox"/> Cigarros    1-10   <input type="checkbox"/> 11-20   <input type="checkbox"/> &gt;20   <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Puros    _____</p> <p><input type="checkbox"/> Pipa    _____</p> <p><b>13.</b> En caso de no ser actualmente fumador, ¿ha fumado alguna vez?</p> <p style="text-align: center;">Cigarros    Puros    Pipa</p> <p><input type="checkbox"/> SI    <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> NO    <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p><b>14.</b> ¿A qué edad empezó usted a fumar?</p> <p style="text-align: center;">Cigarros    Puros    Pipa</p> <p>Edad en años    <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p><b>15a.</b> ¿A qué edad dejó usted al hábito de fumar?</p> <p style="text-align: center;">Cigarros    Puros    Pipa</p> <p>Edad en años    <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p><b>15b.</b> En el momento del diagnóstico de su enfermedad ¿Usted fumaba?</p> <p><input type="checkbox"/> SI</p> <p><input type="checkbox"/> NO</p> <p><input type="checkbox"/> Ex-fumador</p>	<p><b>Copas:</b></p> <p>¿Toma alguna copa a diario?</p> <p><input type="checkbox"/> Sí, ¿cuántos vasos (4cl)? _____</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p>¿Toma alguna copa el fin de semana?</p> <p><input type="checkbox"/> Sí, ¿cuántos vasos (4cl)? _____</p> <p><input type="checkbox"/> No</p> <p><b>CUESTIONARIO DEMOGRÁFICO</b></p> <p><b>17.</b> ¿Dónde ha residido usted, por períodos superiores a un año, desde su nacimiento? (especifique su provincia de residencia, el tiempo que ha residido en ella y el tamaño del municipio donde residió). Inclúelo en orden cronológico, del más antiguo al más actual.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;">Residencia principal (provincia y país)</th> <th style="width: 20%;">Duración (nº de años)</th> <th style="width: 20%;">Tamaño*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>2. _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>3. _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>4. _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>5. _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Tamaño del municipio de residencia: indicar en la tabla el código que corresponda al tamaño:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menos de 1.000 hab.</li> <li>2. De 1.000 a 10.000 hab.</li> <li>3. De 10.000 a 50.000 hab.</li> <li>4. De 50.000 a 500.000 hab.</li> <li>5. Más de 500.000 hab.</li> </ol> <p><b>18.</b> ¿Tiene usted hijos? (no incluya los hijos adoptados)</p> <p><input type="checkbox"/> SI, ¿cuántos? _____</p> <p><input type="checkbox"/> NO</p> <p><b>19.</b> ¿Tiene algún hermano/a (con el que usted comparta al menos un padre o madre biológico)?</p> <p><input type="checkbox"/> SI    ¿Cuántos hermanos? _____</p> <p><input type="checkbox"/> NO    ¿Cuántas hermanas? _____</p> <p><input type="checkbox"/> NO SABE</p>	Residencia principal (provincia y país)	Duración (nº de años)	Tamaño*	1. _____	_____	_____	2. _____	_____	_____	3. _____	_____	_____	4. _____	_____	_____	5. _____	_____	_____	<p style="text-align: right;">AD-002-01</p> <p style="text-align: right;">2</p>
Residencia principal (provincia y país)	Duración (nº de años)	Tamaño*																		
1. _____	_____	_____																		
2. _____	_____	_____																		
3. _____	_____	_____																		
4. _____	_____	_____																		
5. _____	_____	_____																		

## ANEXO 2. CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO

PSE-IMID-Kit	Formulario Epidemiológico BNADN-IMID-Kit	Comisión Clínica
--------------	--	------------------

**20.** ¿Tiene algún hijo, hermano, ... con alguna **discapacidad intelectual**?

SI Indique parentesco: \_\_\_\_\_  
 Tipo de discapacidad: \_\_\_\_\_  
 Grado (>33%, <60%, >65%) \_\_\_\_\_

NO

**IDIOMAS**

**21.** ¿Cuál es la **lengua** (o lenguas) que usted aprendió en su infancia y que aún puede entender?

1. Castellano  
 2. Català  
 3. Euskara  
 4. Galego  
 5. Alemán  
 6. Inglés  
 7. Francés  
 8. Otros (especifique) \_\_\_\_\_

**22.** ¿Qué otros **idiomas** habla o comprende?

1. Inglés  
 2. Francés  
 3. Alemán  
 4. Portugués  
 5. Italiano  
 6. Otros (especifique) \_\_\_\_\_

**ESTUDIOS**

**23.** ¿Cuáles son sus estudios oficiales de más alto nivel que ha alcanzado?

1. Estudios primarios (graduado escolar)  
 2. Formación Profesional de 1º grado  
 3. Formación Profesional de 2º grado  
 4. Bachillerato Superior (BUP, bachillerato, LOGSE, COU, PREU)  
 5. Diplomatura, arquitectura o ingeniería técnica  
 6. Licenciatura, arquitectura o ingeniería  
 7. Doctorado  
 8. Ninguno

**CUESTIONARIO GENEALÓGICO**

	NACIMIENTO			FALLECIMIENTO		
	Lugar (provincia y país)	Tamaño del municipio*	Edad actual	Lugar (provincia y país)	Tamaño del municipio*	Edad de fallecimiento
Donante						
Padres	Padre					
	Madre					
Abuelos	Abuelo materno					
	Abuela materna					
	Abuelo paterno					
	Abuela paterna					

\*Tamaño del municipio de residencia: indicar en la tabla el código que corresponda al tamaño:  
**1.** Menos de 1.000 hab.  
**2.** De 1.000 a 10.000 hab.  
**3.** De 10.000 a 50.000 hab.  
**4.** De 50.000 a 500.000 hab.  
**5.** Más de 500.000 hab.

AD-002-01 \_\_\_\_\_ 3

## ANEXO 3. CUESTIONARIO CLINICO-AR

PSE-IMID-Kit	Formulario Clínico Reumatología	Comisión Clínica de Reumatología
<b>ARTRITIS REUMATOIDE</b>		
<b>A.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>		
1.- Pacientes que cumplan los criterios diagnósticos de AR definidos por el ACR		
2.- AR de más de dos años de evolución		
3.- Pacientes con AR erosiva definida por la presencia de $\geq 1$ erosión en al menos 2 grupos articulares en manos y/o pies		
4.- Edad $\geq$ a 18 años		
5.- Caucásico		
6.- Abuelos y padres de origen español		
¿El paciente cumple todos los criterios de inclusión? <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
<b>B.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>		
1.- Psoriasis cutánea		
2.- Enfermedad inflamatoria intestinal (Enf. de Crohn o Colitis ulcerosa)		
¿Se han comprobado todos los criterios de exclusión? <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
<b>C.- ANTECEDENTES FAMILIARES</b>		
1.- <u>Psoriasis</u> <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
<input type="checkbox"/> padre <input type="checkbox"/> madre <input type="checkbox"/> hermanos nº _____ <input type="checkbox"/> hijos nº _____		
<input type="checkbox"/> abuelo/a pat <input type="checkbox"/> abuelo/a mat <input type="checkbox"/> tíos nº _____ <input type="checkbox"/> sobrinos nº _____		
Existen $\geq 3$ miembros con Ps <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
Nota: Pacientes con AR con $\geq 3$ miembros con Ps (de cualquier forma clínica) entre sus familiares de primer y segundo grado.		
2.- <u>EII</u> <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
<input type="checkbox"/> Enfermedad de Crohn (grado de parentesco _____)		
<input type="checkbox"/> Colitis ulcerosa (_____)		
3.- <u>Artropatía inflamatoria crónica (AIC)</u> <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
<input type="checkbox"/> Espondilitis anquilosante (_____)		
<input type="checkbox"/> Artritis psoriásica (_____)		
<input type="checkbox"/> Artritis reactiva (_____)		
<input type="checkbox"/> Artritis reumatoide (_____)(_____)(_____)		
<input type="checkbox"/> No fillado		
Existen $\geq 2$ miembros con AR <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
Nota: Pacientes con AR con $\geq 2$ miembros con AR entre sus familiares de primer y segundo grado.		
4.- <u>Artritis simétrica</u> <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
4.1.- Fecha de la Rx leída ( / / ) <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si		
Formato digital <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no		
Nota: Incluir datos de radiografías obtenidas dentro de los 6 meses previos a la inclusión. En caso contrario es preferible solicitar una nueva Rx.		
4.2.- Número de erosiones <input type="text" value=""/>		
Nota: Se leerán solo determinadas áreas.		
Manos: 1-5 IFPs, 1-5 MTCs, huesos del carpo y bases de los MTCs como una única área, radio distal y cubital distal.		
Pies: 1-5 MTFs		
- Número total de áreas 36 (18 x2)		
Se adjudicará un valor máximo de 1 en cualquiera de estas áreas si existe		
1.- Una o más erosiones definidas como pérdida de la continuidad de la cortical, o		
2.- Pérdida de la forma ósea normal (referida como presencia de remodelado o pérdida de volumen óseo).		
Puntuación máxima: 36. Rango 2-36.		
La presencia aislada de pinzamiento no se valora.		
AD-003-V01		1

**ANEXO 3. CUESTIONARIO CLINICO-AR**

Formulario Clínico Reumatología	Comisión Clínica de Reumatología																								
PSE-IMID-Kit																									
<p>5.- <u> Marcadores</u></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Factor reumatoide</td> <td style="width: 50%;">Determinación 1</td> <td style="width: 50%;">Determinación 2</td> </tr> <tr> <td>Anti-CCP</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>ANA</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>HLA-DRB1</td> <td>----- / -----</td> <td></td> </tr> </table> <p style="font-size: small;">Nota: 1) FR: Deben estar documentadas 2 determinaciones. Anotar los dos títulos más elevados.                  2) Anti-CCP y ANA: Debe estar documentada 1 determinación. Anotar el título más elevado.                  3) HLA: Anotar si disponible.</p> <p>6.- <u> Prótesis articulares</u>    <input type="checkbox"/> no    <input type="checkbox"/> si</p> <p><input type="checkbox"/> Rodilla Derecha (año _____)    <input type="checkbox"/> Rodilla izquierda ( _____ )  <input type="checkbox"/> Cadera Derecha ( _____ )    <input type="checkbox"/> Cadera Izquierda ( _____ )  <input type="checkbox"/> Hombro Derecho ( _____ )    <input type="checkbox"/> Hombro Izquierdo ( _____ )</p> <p>7.- <u> Luxación atloidea/axoidea</u>    <input type="checkbox"/> nd    <input type="checkbox"/> no (año _____)    <input type="checkbox"/> si ( _____ )</p> <p><input type="checkbox"/> sup    <input type="checkbox"/> ant    <input type="checkbox"/> sup/ant    Cirugía:    <input type="checkbox"/> no    <input type="checkbox"/> si ( _____ )</p> <p><b>E.- VARIABLES CLÍNICAS EXTRA-ARTICULARES</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Año diagnóstico</th> <th style="width: 70%;">Procedimiento diagnóstico*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Escleritis/Episcleeritis</td> <td><input type="checkbox"/> Oftalmólogo    <input type="checkbox"/> Reumatólogo</td> </tr> <tr> <td>Fibrosis pulmonar</td> <td><input type="checkbox"/> Rx    <input type="checkbox"/> TAC</td> </tr> <tr> <td>Pleuritis</td> <td><input type="checkbox"/> Auscultación    <input type="checkbox"/> Rx    <input type="checkbox"/> TAC</td> </tr> <tr> <td>Pericarditis</td> <td><input type="checkbox"/> Auscultación    <input type="checkbox"/> Rx    <input type="checkbox"/> TAC    <input type="checkbox"/> ECG</td> </tr> <tr> <td>Vasculitis&amp; ( _____ )</td> <td><input type="checkbox"/> Inspección cutánea <input type="checkbox"/> Biopsia (AP:.....)</td> </tr> </tbody> </table>		Factor reumatoide	Determinación 1	Determinación 2	Anti-CCP			ANA			HLA-DRB1	----- / -----		Año diagnóstico	Procedimiento diagnóstico*	Escleritis/Episcleeritis	<input type="checkbox"/> Oftalmólogo <input type="checkbox"/> Reumatólogo	Fibrosis pulmonar	<input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC	Pleuritis	<input type="checkbox"/> Auscultación <input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC	Pericarditis	<input type="checkbox"/> Auscultación <input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC <input type="checkbox"/> ECG	Vasculitis& ( _____ )	<input type="checkbox"/> Inspección cutánea <input type="checkbox"/> Biopsia (AP:.....)
Factor reumatoide	Determinación 1	Determinación 2																							
Anti-CCP																									
ANA																									
HLA-DRB1	----- / -----																								
Año diagnóstico	Procedimiento diagnóstico*																								
Escleritis/Episcleeritis	<input type="checkbox"/> Oftalmólogo <input type="checkbox"/> Reumatólogo																								
Fibrosis pulmonar	<input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC																								
Pleuritis	<input type="checkbox"/> Auscultación <input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC																								
Pericarditis	<input type="checkbox"/> Auscultación <input type="checkbox"/> Rx <input type="checkbox"/> TAC <input type="checkbox"/> ECG																								
Vasculitis& ( _____ )	<input type="checkbox"/> Inspección cutánea <input type="checkbox"/> Biopsia (AP:.....)																								
<p>Amitiloidosis</p> <p><input type="checkbox"/> B.Grasa    <input type="checkbox"/> Rectal    <input type="checkbox"/> Renal</p> <p><input type="checkbox"/> Asintomática <input type="checkbox"/> Sintomática</p> <p>Síndrome Seco</p> <p><input type="checkbox"/> T.Schirmer    <input type="checkbox"/> R. Bergala</p> <p><input type="checkbox"/> Xeroftalmia <input type="checkbox"/> Xerostomía</p> <p style="font-size: x-small;">* Indicar únicamente el procedimiento por el que se ha realizado el diagnóstico &amp; Anotar localización</p>	<p><b>F.- ENFERMEDADES ASOCIADAS (diagnosticadas y documentadas)</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">Año diagnóstico</th> <th style="width: 40%;">Año diagnóstico</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. Dislipemia<sup>‡</sup></td> <td>6. Angor</td> </tr> <tr> <td>2. HTA</td> <td>7. IAM</td> </tr> <tr> <td>3. DM tipo II</td> <td>8. AVC</td> </tr> <tr> <td>4. Uveítis anterior</td> <td>9. C. Intermitente</td> </tr> <tr> <td>5. Neoplasia<sup>§</sup> (tipo):</td> <td>10. Apendicectomía</td> </tr> </tbody> </table> <p style="font-size: x-small;"><sup>‡</sup> Solo si recibe tratamiento farmacológico  <sup>§</sup> Incluir neoplasias cutáneas</p> <p>10.- <u>Otras enfermedades inflamatorias crónicas/autoinmunes asociadas:</u></p> <p><input type="checkbox"/> Colagenosis    <input type="checkbox"/> DM tipo I  <input type="checkbox"/> Vitiligo    <input type="checkbox"/> Enfermedad de Addison  <input type="checkbox"/> Fenómeno de Raynaud    <input type="checkbox"/> Alopecia areata  <input type="checkbox"/> Tiroiditis autoinmune    <input type="checkbox"/> Gastritis autoinmune  <input type="checkbox"/> Hepatitis autoinmune    <input type="checkbox"/> Citopenias autoinmunes  <input type="checkbox"/> Esclerosis múltiple    <input type="checkbox"/> Pénfigo  <input type="checkbox"/> Fibrosis pulmonar primaria                  Otras (especificar) _____</p>	Año diagnóstico	Año diagnóstico	1. Dislipemia <sup>‡</sup>	6. Angor	2. HTA	7. IAM	3. DM tipo II	8. AVC	4. Uveítis anterior	9. C. Intermitente	5. Neoplasia <sup>§</sup> (tipo):	10. Apendicectomía												
Año diagnóstico	Año diagnóstico																								
1. Dislipemia <sup>‡</sup>	6. Angor																								
2. HTA	7. IAM																								
3. DM tipo II	8. AVC																								
4. Uveítis anterior	9. C. Intermitente																								
5. Neoplasia <sup>§</sup> (tipo):	10. Apendicectomía																								
AD-003-V01	2																								

**ANEXO 3. CUESTIONARIO CLINICO-AR**

PSE-IMD-Kt	Formulario Clínico Reumatología	Comisión Clínica de Reumatología
------------	---------------------------------	----------------------------------

**G.- TRATAMIENTO**  
 1.- DMARDs previos: nº \_\_\_\_\_  
 no  sí  Respondedor  No-Respondedor

Nota:  
 Extremos terapéuticos  
 - Respondedores: AR en remisión completa (ACR 70 o DAS28<2,6) con un primer anti-TNF durante un periodo superior a 3 años (o con un segundo anti-TNF si el primero se retiró por un efecto adverso).  
 - No-Respondedores: No respuesta (ACR<20 o EULAR nula) a dos anti-TNF y que se hayan retirado por ineficacia antes de un año de tratamiento

Duración (meses)	EAdverso*	Duración (meses)	EAdverso*
Salas oro	Azatioprina		
Antipalúdicos	Ciclosporina		
Salazopirina	Penicilamina		
Metotrexato	Ciclofosfamida		
Leflunomida	Clorambucil		

\*Anotar solo aquel efecto adverso que obligó a la retirada del fármaco.

2.- Terapias biológicas previas: nº \_\_\_\_\_

Fecha	Visita basal	Visita 12 sem	Última visita
<b>Fármaco</b>			
<b>Dosis</b>			
<b>DAS28</b>			
<b>ACR</b>			
<b>Eva. Clínica#</b>			
<b>Retirada*</b>			

Nota:  
 - Incluir DAS28 y/o ACR (según disponibilidad)  
 - \*En caso de no disponer de estos datos, evaluar según práctica clínica: Eficacia, Ineficacia y Pérdida de eficacia a la S12 y en la última visita.  
 - Motivo retirada\* (Ineficacia/Pérdida de eficacia/Efectos adversos (especificar)\*)  
 - Terapias biológicas: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab, Anakinra  
 - Última visita hace referencia a la fecha de retirada del fármaco o a la última vez que se visitó el paciente (posiblemente la fecha de inclusión en el estudio)

- Efectos adversos\*:  
 Alopecia Aftas Aplasia  
 Erupción cutánea Hepatotoxicidad Hipertensión Citopenia  
 Hipertricotosis Inf. Bacteriana Inf. Virica Insuficiencia renal  
 Intolerancia g-I Neoplasia Neumonitis  
 Pancreatitis Proteinuria R. lugar de inyección  
 Otros (especificar) \_\_\_\_\_ R. a la infusión

**H.- ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD EN EL MOMENTO DE LA EXTRACCIÓN**  
 1.- Fecha (debe coincidir con la fecha de la extracción) ( / / )  
 2.- DAS28 [ ]  
 3.- HAQ [ ]  
 3.- Clase funcional (Steinbroker)  I  II  III  IV  
 4.- Tratamiento

Dosis	Vía	Dosis	Vía
Metotrexato		Salas oro	
Antipalúdicos		Azatioprina	
Salazopirina		Ciclosporina	
Leflunomida		Penicilamina	
Infliximab		Ciclofosfam.	
Etanercept		Clorambucil	
Adalimumab		Anakinra	
Rituximab		Abatacept	
Glucocortic.		Omeprazol	
AINEs:		Bifosfonatos:	
Otros:		Otros:	

AD-003-V01 3

**ANEXO 5.** Nombre oficial de los genes asociados con la respuesta identificados en el GWAS

Estrategia	Gen	Nombre oficial	GeneID
$\Delta$ DAS28	GLT25D2	glycosyltransferase 25 domain containing 2	23127
$\Delta$ DAS28	MRPS22	mitochondrial ribosomal protein S22	56945
$\Delta$ DAS28	FLJ30375	uncharacterized LOC440982	440982
$\Delta$ DAS28	SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	9037
$\Delta$ DAS28	HTR1A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled	3350
$\Delta$ DAS28	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	3486
$\Delta$ DAS28	C8orf86	chromosome 8 open reading frame 86	389649
$\Delta$ DAS28	HNF4G	hepatocyte nuclear factor 4, gamma	3174
$\Delta$ DAS28	COL5A1	collagen, type V, alpha 1	1289
$\Delta$ DAS28	TYRP1	tyrosinase-related protein 1	7306
$\Delta$ DAS28	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	4255
$\Delta$ DAS28	AICF	APOBEC1 complementation factor	29974
$\Delta$ DAS28	OR8A1	olfactory receptor, family 8, subfamily A, member 1	390275
$\Delta$ DAS28	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	4257
$\Delta$ DAS28	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	1975
$\Delta$ DAS28	NPAS3	neuronal PAS domain protein 3	64067
$\Delta$ DAS28	LOC729911	uncharacterized LOC729911	729911
$\Delta$ DAS28	WDR72	WD repeat domain 72	256764
$\Delta$ DAS28	ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	3675
$\Delta$ DAS28	PAK7	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7	57144
$\Delta$ DAS28	MSRA	methionine sulfoxide reductase A	4482
$\Delta$ DAS28	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	22861
$\Delta$ DAS28	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	3572
$\Delta$ DAS28	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	3488
$\Delta$ DAS28	HTR3A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic	3359
$\Delta$ DAS28	MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	5605
$\Delta$ DAS28	CDK7	cyclin-dependent kinase 7	1022
$\Delta$ DAS28	CYP2C8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	1558
$\Delta$ DAS28	GDNF	glial cell derived neurotrophic factor	2668
$\Delta$ DAS28	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435
$\Delta$ DAS28	HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled	3356
$\Delta$ DAS28	CCDC125	coiled-coil domain containing 125	202243
EULAR	CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	1396
EULAR	ANKRD34B	ankyrin repeat domain 34B	340120
EULAR	TRIM25	tripartite motif containing 25	7706
EULAR	NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	114548
EULAR	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	1441
EULAR	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	10010
EULAR	EMCN	endomucin	51705
EULAR	SLC22A5	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5	6584
EULAR	TSLP	thymic stromal lymphopoietin	85480
EULAR	PIK3CG	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma	5294
EULAR	CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	9420
EULAR	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	2185
EULAR	DLG5	discs, large homolog 5 (Drosophila)	9231
EULAR	ADAM12	ADAM metalloproteinase domain 12	8038
EULAR	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	2113
EULAR	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	4312
EULAR	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	4314
EULAR	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	960
EULAR	DCC	deleted in colorectal carcinoma	1630
$\Delta$ DAS28/EULAR	SLC24A3	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3	57419
$\Delta$ DAS28/EULAR	RNF19B	RiNg Finguer protein 19B	Error
$\Delta$ DAS28/EULAR	GLT25D2	glycosyltransferase 25 domain containing 2	23127
$\Delta$ DAS28/EULAR	MRPS22	mitochondrial ribosomal protein S22	56945
$\Delta$ DAS28/EULAR	ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	6092
$\Delta$ DAS28/EULAR	GRM7	glutamate receptor, metabotropic 7	2917
$\Delta$ DAS28/EULAR	F11	coagulation factor XI	2160
$\Delta$ DAS28/EULAR	GALNT17	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6	442117
$\Delta$ DAS28/EULAR	DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	91351

**ANEXO 5.** Nombre oficial de los genes asociados con la respuesta identificados en el GWAS

<b>Estrategia</b>	<b>Gen</b>	<b>Nombre oficial</b>	<b>GeneID</b>
$\Delta$ DAS28/EULAR	LHX2	LIM homeobox 2	9355
$\Delta$ DAS28/EULAR	FGD3	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3	89846
$\Delta$ DAS28/EULAR	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	1975
$\Delta$ DAS28/EULAR	ANKRD34C	ankyrin repeat domain 34C	390616
$\Delta$ DAS28/EULAR	ONECUT1	one cut homeobox 1	3175
$\Delta$ DAS28/EULAR	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	22861
$\Delta$ DAS28/EULAR	ZNF350	zinc finger protein 350	59348
$\Delta$ DAS28/EULAR	NLRP13	NLR family, pyrin domain containing 13	126204
$\Delta$ DAS28/EULAR	LINC00478	long intergenic non-protein coding RNA 478	388815



**ANEXO 6.** Nombre oficial de los genes asociados con la respuesta identificados en los artículos publicados previamente

Artículo	Gen	Nombre	GeneID
Liu	LMO4	LIM domain only 4	8543
Liu	GBP6	guanylate binding protein family, member 6	163351
Liu	LASS6	ceramide synthase 6	253782
Liu	CENTD1	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	116984
Liu	QKI	QKI, KH domain containing, RNA binding	9444
Liu	PON1	paraoxonase 1	5444
Liu	PON1	paraoxonase 1	5444
Liu	PON1	paraoxonase 1	5444
Liu	IFNK	interferon, kappa	56832
Liu	MOBK2B	MOB kinase activator 3B	79817
Liu	C9orf72	chromosome 9 open reading frame 72	203228
Liu	MOBK2B	MOB kinase activator 3B	79817
Liu	C9orf72	chromosome 9 open reading frame 72	203228
Liu	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	9935
Liu	CST5	cystatin D	1473
Liu	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	9935
Plant	LMX1A	LIM homeobox transcription factor 1, alpha	4009
Plant	PDZD2	PDZ domain containing 2	23037
Plant	EYA4	eyes absent homolog 4 (Drosophila)	2070
Plant	LOC387845	NotFound	NotFound
Plant	TEC	transient erythroblastopenia of childhood	100124696
Plant	LOC196188	NotFound	NotFound
Plant	MRPL42	mitochondrial ribosomal protein L42	64974
Cui	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	5788
Cui	CD58	CD58 molecule	965
Cui	PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8	5779
Cui	TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14	8764
Cui	REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	5966
Cui	CTLA4	celiac disease 3	317783
Cui	CD28	celiac disease 3	317783
Cui	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	6775
Cui	PLCL2	phospholipase C-like 2	23228
Cui	TNIP2	TNFAIP3 interacting protein 2	79155
Cui	IL2-IL21	NotFound	NotFound
Cui	PRL	prolactin	5617
Cui	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7128
Cui	PRDMI	PR domain containing 1, with ZNF domain	11110
Cui	HLA*0101	NotFound	NotFound
Cui	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2	3120
Cui	HLA*0401	NotFound	NotFound
Cui	TAGAP	reserved	94011
Cui	HLA*DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	3115
Cui	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7128
Cui	PODXL	podocalyxin-like	5420
Cui	CDK6	cyclin-dependent kinase 6	1021
Cui	BLK	B lymphoid tyrosine kinase	640
Cui	CCL21	chemokine (C-C motif) ligand 21	6366
Cui	TRAF1-C5	NotFound	NotFound
Cui	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	3559
Cui	PRKCQ	protein kinase C, theta	5588
Cui	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase	7189
Cui	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	958
Cui	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	3560
Potter	CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1147
Potter	IRAK-3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	11213
Potter	MyD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	4615
Potter	NFkBIB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	4793
Potter	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	5743
Potter	TLR-2	toll-like receptor 2	7097
Potter	TLR-10/1/6	NotFound	NotFound

**ANEXO 7.** Centros e investigadores principales participantes en el proyecto PSE IMID-kit

Centro	Ciudad	Investigador Principal
Hospital Universitari Vall de Hebron, Unitat de Recerca de Reumatologia	Barcelona	Dra. Sara Marsal
Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Servei de Reumatologia	Barcelona	Dr. Juan Cañete
Hospital Universitario Guadalajara, Servicio de Reumatología	Guadalajara	Dr. Jesús Tornero
Hospital Juan Canalejo, Servicio de Reumatología	Coruña	Dr. Francisco Blanco
Hospital del Mar, Servei de Reumatologia	Barcelona	Dr. Joan Maymó
Hospital Universitario Central de Asturias, Servicio de Reumatología	Asturias	Dr. Javier Ballina
Hospital Clínico San Carlos, Servicio de Reumatología	Madrid	Dr. Benjamín Fernández
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Servicio de Reumatología	Badalona	Dr. Alex Olivé
Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Servicio de Reumatología	Málaga	Dr. Antonio Fernandez Nebro
Hospital Sant Rafael, Servicio de Reumatología	Barcelona	Dr. Isabel Rotes
Hospital Universitario La Princesa, Servicio de Reumatología	Madrid	Dr. Isidoro González
Hospital comarcal Amposta, Servei de Reumatologia	Amposta	Dr. Carles Tomás
Centro de Especialidades Inocencio Jiménez, Consulta de Reumatología	Zaragoza	Dra. Concepción Delgado
Hospital Moises Broggi, Servicio de Reumatología	Hospitalet de Llobregat	Dr. Hector Corominas

---

## BIBLIOGRAFIA

---

- 1.- Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. Best practice & research. *Clinical rheumatology*. 2010; 24(6): 733-45.
- 2.- Kvien TK, Uhlig T, Ødegård S, Heiberg MS. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1069: 212-22.
- 3.- Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2005; 34(4): 662-7.
- 4.- Biver E, Beague V, Verloop D, Mollet D, Lajugie D, Baudens G, et al. Low and stable prevalence of rheumatoid arthritis in northern France. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*. 2009; 76(5): 497-500.
- 5.- Kiss CG. based on a representative survey of 10, 000 inhabitants. Prevalence of Rheumatoid Arthritis in the South- Transdanubian Region of Hungary Based on a Representative Survey of 10, 000 Inhabitants. *Journal of Rheumatology*. 2005; 32(9): 32-5.
- 6.- Zeng QY, Chen R, Darmawan J, Xiao ZY, Chen SB, Wigley R, et al. Rheumatic diseases in China. *Arthritis research & therapy*. 2008; 10(1): R17.
- 7.- Spindler A, Bellomio V, Berman A, Lucero E, Baigorria M, Paz S, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucumán, Argentina. *The Journal of rheumatology*. 2002; 29(6): 1166-70.
- 8.- da Mota LMH, Laurindo IMM, dos Santos Neto LL. Demographic and clinical characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010 Jun; 50(3): 235-48.
- 9.- Teng E, Leong KP, Li HH, Thong B, Koh ET, Loi PL, Zhao Y, Tan EK; TTSH RA Study Group. Analysis of a genome-wide association study-linked locus (CCR6) in Asian rheumatoid arthritis. *DNA Cell Biol*. 2012 Apr; 31(4): 607-10
- 10.- Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism*. 2002; 46(3): 614-24.
- 11.- Sharif S, Thomas JM, Donley D a, Gilleland DL, Bonner DE, McCrory JL, et al. Resistance exercise reduces skeletal muscle cachexia and improves muscle function in rheumatoid arthritis. *Case reports in medicine*. 2011; 2011: 205-691.
- 12.- Simsek I. TNF Inhibitors. *Prevention*. 2010; 68(3): 204-10.
- 13.- Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, et al. Cytokine The À1082A / G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Cytokine*. 2011; 56(2): 351-5.
- 14.- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, 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 and rheumatism*. 2006; 54(1): 38-46.
- 15.- Scott IC, Steer S, Lewis CM, Cope a P. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology - linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 2011; 25(4): 447-68.
- 16.- Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, et al. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(3): 385-95.

- 17.- Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan M a, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. *Journal of autoimmunity*. 2012; 38(2-3): J156-69.
- 18.- Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50(10): 3085-92.
- 19.- Ruiz-Esquide V, Gómez-Puerta J a, Cañete JD, Graell E, Vazquez I, Ercilla MG, et al. Effects of smoking on disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2011; 38(12): 2536-9.
- 20.- Westhoff G, Rau R, Zink a. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008; 47(6): 849-54.
- 21.- Mahdi H, Fisher B a, Källberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J, et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2009; 41(12): 1319-24.
- 22.- Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil a HM, van Gaalen F a, Kloppenburg M, de Vries RRP, le Cessie S, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006; 65(3): 366-71.
- 23.- Karlson EW, Chang S-C, Cui J, Chibnik LB, Fraser P a, De Vivo I, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(1): 54-60.
- 24.- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis research & therapy*. 2006; 8(4): R133.
- 25.- Lee S, Hayashi H, Maeda M, Chen Y, Matsuzaki H, Takei-Kumagai N, et al. Environmental factors producing autoimmune dysregulation - chronic activation of T cells caused by silica exposure. *Immunobiology*. 2012; 217(7): 743-8.
- 26.- Rocha MC, Santos LMB, Bagatin E, Cohen Tervaert JW, Damoiseaux JGMC, Lido AV, et al. Genetic polymorphisms and surface expression of CTLA-4 and PD-1 on T cells of silica-exposed workers. *International journal of hygiene and environmental health*. 2012; 215(6): 562-9.
- 27.- Pedersen M, Stripp C, Klarlund M, Olsen SF, Tjønneland AM, Frisch M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. *The Journal of rheumatology*. 2005; 32(7): 1249-52.
- 28.- Cerhan JR. Antioxidant Micronutrients and Risk of Rheumatoid Arthritis in a Cohort of Older Women. *American Journal of Epidemiology*. 2003; 157(4): 345-54.
- 29.- Shapiro JA, Koepsell TD, Voigt LF, Dugowson CE, Kestin M NJ. Diet and rheumatoid arthritis in women: a possible protective effect of fish consumption. *Epidemiology*. 1996; 7(3): 256-63.
- 30.- Karlson EW, Mandl L a, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2003; 48(11): 3055-60.
- 31.- Källberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Garred P, Frisch M, et al. studies. 2010; 68(2): 222-7.
- 32.- Maxwell JR, Gowers IR, Moore DJ, Wilson AG. Alcohol consumption is inversely associated with risk and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010; 49(11): 2140-6.

- 33.- Pender MP. CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune diseases*. 2012; 2012(3): 189096.
- 34.- Tzang B-S, Tsai C-C, Tsay GJ, Wang M, Sun Y-S, Hsu T-C. Anti-human parvovirus B19 nonstructural protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 405(1-2): 76-82.
- 35.- Jørgensen KT, Pedersen BV, Jacobsen S, Biggar RJ, Frisch M. National cohort study of reproductive risk factors for rheumatoid arthritis in Denmark: a role for hyperemesis, gestational hypertension and pre-eclampsia? *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(2): 358-63.
- 36.- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*. 1993; 32(10): 903-7.
- 37.- MacGregor J, Snieder H, Rigby S, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism*. 2000; 43(1): 30-7.
- 38.- Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *American journal of human genetics*. 1990; 46(2): 229-41.
- 39.- Vyse TJ, Todd JA, Street J. Genetic Analysis of Autoimmune Disease Review. 1996; 85: 311-8.
- 40.- Julià A, Marsal S. Enfermedades complejas: artritis reumatoide como modelo de estudio. *Medicina Clínica*. 2003; 121(16): 616-8.
- 41.- Grant SF, Thorleifsson G, Frigge ML, Thorsteinsson J, Gunnlaugsdóttir B, Geirsson AJ, et al. The inheritance of rheumatoid arthritis in Iceland. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(10): 2247-54.
- 42.- Rigby AS, Silman AJ, Voelm L, Gregory JC, Ollier WE, Khan MA, Nepom GT TG. Investigating the HLA component in rheumatoid arthritis: an additive (dominant) mode of inheritance is rejected, a recessive mode is preferred. *Genet Epidemiol*. 1991; 8(3): 153-75.
- 43.- Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1976; 57(5): 1148-57.
- 44.- Man- B. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999; 401(6756): 921-3.
- 45.- Harris E, Budd R, Firestein G, Genovese M, Sergent J, Ruddy S, Sledge C. *Kelley Tratado de Reumatología*. 7ª ed. Madrid: Elsevier; 2006.
- 46.- Gregersen PK, Silver J WR. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987; 30(11): 1205-13.
- 47.- Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS genetics*. 2008; 4(4): e1000024.
- 48.- Gonzalez-Gay M, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2002; 31(6): 355-60.
- 49.- De Almeida DE, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P, Holoshitz J. Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. *J Immunol*. 2010; 185(3): 1927-34
- 50.- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011; 365(23): 2205-19.

- 51.- Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, Nuñez-Roldan A SB. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1\*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(6): 811-4.
- 52.- Hajeer a H, Dababneh a, Makki RF, Thomson W, Poulton K, González-Gay M a, et al. Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue antigens.* 2000; 55(4): 319-25.
- 53.- MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D SA. HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol.* 1995; 22(6): 1032-6.
- 54.- Reneses S, González-Escribano MF, Fernández-Suárez A, Pestana L, Davila B, Wichmann I, et al. The value of HLA-DRB1 shared epitope, -308 tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism, rheumatoid factor, anti-citrullinated peptide antibodies, and early erosions for predicting radiological outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology.* 2009; 36(6): 1143-9.
- 55.- Orozco G, McAllister K, Eyre S. Genetics of rheumatoid arthritis: GWAS and beyond. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* 2011;3: 31-46.
- 56.- Chelala C, Duchatelet S, Joffret M-L, Bergholdt R, Dubois-Laforgue D, Ghandil P, et al. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes.* 2007;56 (2): 522-6.
- 57.- Nong L-M, Ren K-W, Xu N-W, Zhou D. 1858 C/T polymorphism of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 gene and rheumatoid arthritis risk in europeans: a meta-analysis. *Archives of medical research.* 2011; 42(8): 698-702.
- 58.- Martín J-E, Alizadeh BZ, González-Gay M a, Balsa A, Pascual-Salcedo D, González-Escribano MF, et al. Evidence for PTPN22 R620W polymorphism as the sole common risk variant for rheumatoid arthritis in the 1p13.2 region. *The Journal of rheumatology.* 2011; 38(11): 2290-6.
- 59.- Li X, Zhang C, Zhang J, Zhang Y, Wu Z, Yang L, Xiang Z, Qi Z, Zhang X, Xiao X. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Clin Immunol.* 2012;32 (3): 530-9
- 60.- Palomino-Morales RJ, Diaz-Gallo L-M, Witte T, Anaya J-M, Martín J. Influence of STAT4 polymorphism in primary Sjögren's syndrome. *The Journal of rheumatology.* 2010; 37(5): 1016-9.
- 61.- Tsuchiya N, Kawasaki a, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, et al. Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Annals of the rheumatic diseases.* 2009; 68(8): 1375-6.
- 62.- Liang Y-L, Wu H, Shen X, Li P-Q, Yang X-Q, Liang L, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: a meta-analysis. *Molecular biology reports.* 2012; 39(9): 8873-82.
- 63.- Skinningsrud B, Lie B a, Husebye ES, Kvien TK, Førre Ø, Flatø B, et al. A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2010; 69(8): 1471-4.
- 64.- Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman F a S, Liljedahl U, Wiman A-C, Alfredsson L, et al. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2007; 56(7): 2202-10.
- 65.- Garnier S, Dieudé P, Michou L, Barbet S, Tan A, Lasbleiz S, et al. IRF5 rs2004640-T allele, the

new genetic factor for systemic lupus erythematosus, is not associated with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007; 66(6): 828-31.

66.- Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology*. 5<sup>a</sup> ed. Mosby: Elsevier; 2011.

67.- Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012; 51 Suppl 5:v3-v11.

68.- Klaasen R, Thurlings RM, Wijbrandts C a, van Kuijk AW, Baeten D, Gerlag DM, et al. The relationship between synovial lymphocyte aggregates and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis: a prospective study. *Arthritis and rheumatism*. 2009; 60(11): 3217-24.

69.- Thurlings RM, Wijbrandts C a, Mebius RE, Cantaert T, Dinant HJ, van der Pouw-Kraan TCTM, et al. Synovial lymphoid neogenesis does not define a specific clinical rheumatoid arthritis phenotype. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 58(6): 1582-9.

70.- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011; 365(23): 2205-19.

71.- Lally F, Smith E, Filer A, Stone MA, Shaw S, Nash GB, et al. UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript A Novel Mechanism of Neutrophil Recruitment in a Coculture Model of the Rheumatoid Synovium. 2011; 52(11): 3460-9.

72.- Cooles F a H, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2011; 23(3): 233-40.

73.- Sokolove J, Strand V. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Rheumatology*. 2010; 68(3): 232-8.

74.- MacGregor AJ. Classification criteria for rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1995; 9(2): 287-304.

75.- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31(3): 315-24.

76.- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(9): 1580-8.

77.- Van der Linden MPM, Batstra MR, Bakker-Jonges LE, Detert J, Bastian H, Scherer HU, et al. Toward a data-driven evaluation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for rheumatoid arthritis: is it sensible to look at levels of rheumatoid factor? *Arthritis and rheumatism*. 2011; 63(5): 1190-9.

78.- Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(9): 1589-95.

79.- Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 2010; 103(3): 139-46.

80.- Berglin E, Johansson T, Sundin U, Jidell E, Wadell G, Hallmans G, et al. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006; 65(4): 453-8.



- 81.- Nell VPK, Machold KP, Stamm T a, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005; 64(12): 1731-6.
- 82.- Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Vincent C, Salama G, et al. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1993; 92(3): 1387-93.
- 83.- Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, Bizzaro N, Migliorini P, Morozzi G, et al. Diagnostic value of anti-mutated citrullinated vimentin in comparison to anti-cyclic citrullinated peptide and anti-viral citrullinated peptide 2 antibodies in rheumatoid arthritis: An Italian multicentric study and review of the literature. *Autoimmunity reviews*. 2012; 11(11): 815-20.
- 84.- Braun-moscovici Y, Markovits D, Zinder O, Schapira D, Ehrenburg M, Dain L, et al. Anti-Cyclic Citrullinated Protein Antibodies as a Predictor of Response to Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2006; 33(3): 497-500.
- 85.- Klaasen R, Cantaert T, Wijbrandts CA, Teitsma C, Gerlag DM, Out TA, et al. The value of rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies as predictors of response to infliximab in rheumatoid arthritis: an exploratory study. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50(8): 1487-93.
- 86.- Van Gaalen F, Van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50(7): 2113-21.
- 87.- Xue Y, Zhang J, Chen Y-M, Guan M, Zheng SG, Zou H-J. The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2008; 37(3): 183-7.
- 88.- Lee H-S, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis and rheumatism*. 2007; 56(6): 1745-53.
- 89.- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010; 376(9746): 1094-108.
- 90.- Zendman a JW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006; 45(1): 20-5.
- 91.- Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50(2): 380-6.
- 92.- Cavazzana I, Franceschini F, Quinzanini M, Manera C, Del Papa N, Maglione W, et al. Anti-Ro/SSA antibodies in rheumatoid arthritis: clinical and immunologic associations. *Clinical and experimental rheumatology*. 2006; 24(1): 59-64.
- 93.- Boire G, Ménard HA, Gendron M, Lussier A MD. Rheumatoid arthritis: anti-Ro antibodies define a non-HLA-DR4 associated clinicoserological cluster. *Rheumatol*. 1993; 20(10): 1654-60.
- 94.- Smith HS, Smith AR, Seidner P. Painful rheumatoid arthritis. *Pain physician*. 2011; 14(5): E427-58.
- 95.- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Mædica*. 2010; 5(4): 286-91.
- 96.- Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *American family physician*. 2011; 84(11): 1245-52.

- 97.- Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity reviews*. 2011; 11(2): 123-31.
- 98.- Turesson C, Jacobsson L, Bergström U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. *Rheumatology (Oxford, England)*.1999; 38(7): 668-74.
- 99.- Nakamura T, Higashi S-ichi, Tomoda K, Tsukano M, Iyama K-ichi. Cutaneous nodules in patients with rheumatoid arthritis: a case report and review of literatures. *Clinical rheumatology*. 2011; 30(5): 719-22.
- 100.- Seitz CS, Berens N, Bröcker E-B, Trautmann A. Leg ulceration in rheumatoid arthritis--an underreported multicausal complication with considerable morbidity: analysis of thirty-six patients and review of the literature. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2010; 220(3): 268-73.
- 101.- Fujita M, Igarashi T, Kurai T, Sakane M, Yoshino S, Takahashi H. Correlation between dry eye and rheumatoid arthritis activity. *American journal of ophthalmology*. 2005; 140(5): 808-13.
- 102.- Lemp MA. Dry eye (Keratoconjunctivitis Sicca), rheumatoid arthritis, and Sjögren's syndrome. *American journal of ophthalmology*. 2005; 140(5): 898-9.
- 103.- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD. Pulmonary manifestations of systemic autoimmune diseases. *Mædica*. 2011; 6(3): 224-9.
- 104.- Balbir-Gurman A, Yigla M, Nahir AM, Braun-Moscovici Y. Rheumatoid pleural effusion. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2006; 35(6): 368-78.
- 105.- Matsushima M, Yaguchi H, Niino M, Akimoto-Tsuji S, Yabe I, Onishi K, et al. MRI and pathological findings of rheumatoid meningitis. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2010; 17(1): 129-32.
- 106.- Tutar NU, Yücel E, Cos M. Case report Pachymeningitis and optic neuritis in rheumatoid arthritis : MRI findings. *Radiology*. 1999; 72: 0-3.
- 107.- Gullick NJ, Scott DL. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. Best practice & research. *Clinical rheumatology*. 2011; 25(4): 469-83.
- 108.- Aviña-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 and rheumatism*. 2008; 59(12): 1690-7.
- 109.- Toledano E, Candelas G, Rosales Z, Martínez Prada C, León L, Abásolo L, Loza, E, Carmona L, Tobías A, Jover JA. A meta-analysis of mortality in rheumatic diseases. *Reumatol Clin*. 2012. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 22789463.
- 110.- Boyer J-F, Gourraud P-A, Cantagrel A, Davignon J-L, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2011; 78(2): 179-83.
- 111.- Carmona L, Descalzo MA, Perez-Pampin E, Ruiz-Montesinos D, Erra A, Cobo T, et al. All-cause and cause-specific mortality in rheumatoid arthritis are not greater than expected when treated with tumour necrosis factor antagonists. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007; 66(7): 880-5.
- 112.- Ruysse-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loët X, Pham T. Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*. 2011; 78(1): 23-30.
- 113.- Ebert EC, Hagspiel KD. Gastrointestinal and hepatic manifestations of rheumatoid arthritis.

Digestive diseases and sciences. 2011; 56(2): 295-302.

114.- Kim SY, Schneeweiss S, Liu J, Daniel GW, Chang C-L, Garneau K, et al. Risk of osteoporotic fracture in a large population-based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2010; 12(4): R154.

115.- de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *The Journal of rheumatology*. 2008; 35(1): 70-6.

116.- Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis research & therapy*. 2010; 12(5): 218.

117.- Bijlsma JWW, Weinblatt ME. Optimal use of methotrexate: the advantages of tight control. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007; 66(11): 1409-10.

118.- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007; 370(9602): 1861-74.

119.- Sociedad Española de Reumatología. *Guía de Práctica Clínica en España*. Madrid; 2011.

120.- Pasero G, Marson P. A short history of anti-rheumatic therapy. IV. Corticosteroids. *Reumatismo*. 2010; 62(4): 292-9

121.- Pincus T, Swearingen CJ, Luta G, Sokka T. Efficacy of prednisone 1-4 mg/day in patients with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo controlled withdrawal clinical trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(11): 1715-20.

122.- 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): 1-12.

123.- Behrens F, Koehm M, Burkhardt H. Update 2011: leflunomide in rheumatoid arthritis - strengths and weaknesses. *Current opinion in rheumatology*. 2011; 23(3): 282-7.

124.- Halford GM, Lordkipanidzé M, Watson SP. 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. *Platelets*. 2011; 44(October): 1-8.

125.- Poddubnyy D, Song IH, Sieper J. A systematic comparison of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27(4 Suppl 55): S148-51.

126.- Crilly MA, Mangoni AA. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) related inhibition of aldosterone glucuronidation and arterial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional clinical study. *BMJ Open*. 2011; 1(1): e000076.

127.- Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis research*. 2002; 4(4): 266-73.

128.- Borchers AT, Keen CL, Cheema GS, Gershwin ME. The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2004; 34(1): 465-83.

129.- Visser K, van der Heijde D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(7): 1094-9.

- 130.- Alarcón GS. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective. *Immunopharmacology*. 2000; 47(2-3): 259-71.
- 131.- Schnabel A GW. Low-dose methotrexate in rheumatic diseases efficacy, side effects, and risk factors for side effects. *Semin Arthritis Rheum*. 1994; 23(5): 310-27.
- 132.- Strand V, Cohen S, Schiff M, Weaver A, Fleischmann R, Cannon G, et al. Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with placebo and methotrexate. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. *Arch Intern Med*. 1999; 159(21): 2542-50.
- 133.- Verhoeven AC, Boers M, Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: updated systematic review. 1998;612-9.
- 134.- Ma MHY, Kingsley GH, Scott DL. A systematic comparison of combination DMARD therapy and tumour necrosis inhibitor therapy with methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010; 49(1): 91-8.
- 135.- Jagoda JS, Rajapakse CNA. Leflunomide in clinical practice. A retrospective observational study on use of leflunomide in New Zealand. *International journal of rheumatic diseases*. 2011; 14(4): 340-4.
- 136.- Aletaha D, Stamm T, Kapral T, Eberl G, Grisar J, Machold KP, et al. Survival and effectiveness of leflunomide compared with methotrexate and sulfasalazine in rheumatoid arthritis: a matched observational study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003; 62(10): 944-51.
- 137.- Van Roon EN, Jansen TLT a, Mourad L, Houtman PM, Bruyn G a W, Griep EN, et al. Leflunomide in active rheumatoid arthritis: a prospective study in daily practice. *British journal of clinical pharmacology*. 2004; 58(2): 201-8.
- 138.- Van der Heijde D, Kalden J, Scott D, Smolen J, Strand V. Long term evaluation of radiographic disease progression in a subset of patients with rheumatoid arthritis treated with leflunomide beyond 2 years. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63(6): 737-9
- 139.- De Stefano R, Frati E, Nargi F, Baldi C, Menza L, Hammoud M, Galeazzi M. Comparison of combination therapies in the treatment of rheumatoid arthritis: leflunomide-anti-TNF-alpha versus methotrexate-anti-TNF-alpha. *Clin Rheumatol*. 2010; 29(5): 517-24.
- 140.- Azadkhan AK, Truelove SC, Aronson JK. The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1982; 13(4): 523-8
- 141.- Dougados M, Combe B, Cantagrel a, Goupille P, Olive P, Schattenkirchner M, et al. Combination therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised, controlled, double blind 52 week clinical trial of sulphasalazine and methotrexate compared with the single components. *Annals of the rheumatic diseases*. 1999; 58(4): 220-5.
- 142.- Haagsma CJ, van Riel PL, de Jong a J, van de Putte LB. Combination of sulphasalazine and methotrexate versus the single components in early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled, double-blind, 52 week clinical trial. *British journal of rheumatology*. 1997; 36(10): 1082-8.
- 143.- Hider SL, Silman a, Bunn D, Manning S, Symmons D, Lunt M. Comparing the long-term clinical outcome of treatment with methotrexate or sulfasalazine prescribed as the first disease-modifying antirheumatic drug in patients with inflammatory polyarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006; 65(11): 1449-55.
- 144.- Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 59(6): 762-84.

- 145.- Katz SJ, Russell AS. Re-evaluation of antimalarials in treating rheumatic diseases: re-appreciation and insights into new mechanisms of action. *Current opinion in rheumatology*. 2011; 23(3): 278-81.
- 146.- Abarientos C, Sperber K, Shapiro DL, Aronow WS, Chao CP, Ash JY. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and its safety in pregnancy. *Expert opinion on drug safety*. 2011; 10(5): 705-14.
- 147.- Skare T, Ribeiro CF, Souza FHM, Haendchen L, Jordão JM. Antimalarial cutaneous side effects: a study in 209 users. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2011; 30(1): 45-9.
- 148.- O'Dell JR, Leff R, Paulsen G, Haire C, Mallek J, Eckhoff PJ, 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 and rheumatism*. 2002; 46(5): 1164-70.
- 149.- 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. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282(4): 2250-8.
- 150.- Zetterström CK, Jiang W, Wähämaa H, Ostberg T, Aveberger A-C, Schierbeck H, et al. Pivotal advance: inhibition of HMGB1 nuclear translocation as a mechanism for the anti-rheumatic effects of gold sodium thiomalate. *Journal of leukocyte biology*. 2008; 83(1): 31-8.
- 151.- Thakor a S, Jokerst J, Zavaleta C, Massoud TF, Gambhir SS. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. *Nano letters*. 2011; 11(10): 4029-36.
- 152.- Piqué Duran, Enric; Palacios Llopis, Santiago; Rodríguez Mangas C. Crisisis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2002; 93(09): 551-4.
- 153.- Kievit W, Adang EM, Fransen J, Kuper HH, van de Laar M a FJ, Jansen TL, et al. The effectiveness and medication costs of three anti-tumour necrosis factor alpha agents in the treatment of rheumatoid arthritis from prospective clinical practice data. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008; 67(9): 1229-34.
- 154.- Busquets N, Carmona L, Surís X. Systematic review: safety and efficacy of anti-TNF in elderly patients. *Reumatología clínica*. 2011; 7(2): 104-12.
- 155.- Greenberg JD, Reed G, Decktor D, Harrold L, Furst D, Gibofsky A, et al; CORRONA Investigators. A comparative effectiveness study of adalimumab, etanercept and infliximab in biologically naive and switched rheumatoid arthritis patients: results from the US CORRONA registry. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71(7): 1134-42.
- 156.- Marengo de la Fuente JL, Solís Díaz R. Anti-TNF drugs: New results on efficacy. *Reumatología clínica*. 2009; 5S1: 71-6.
- 157.- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;117(2): 244-79.
- 158.- Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2005;34(6): 819-36.
- 159.- den Broeder A, van de Putte L, Rau R, Schattenkirchner M, Van Riel P, Sander O, et al. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab (D2E7) in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(11): 2288-98.

160.- Ficha Técnica-Remicade<sup>®</sup>.EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)

161.- Smolen JS, Han C, Bala M, Maini RN, Kalden JR, van der Heijde D, Breedveld FC, Furst DE, Lipsky PE; ATTRACT Study Group. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(4): 1020-30.

162.- Smolen JS, Han C, van der Heijde DMFM, Emery P, Bathon JM, Keystone E, et al. Radiographic changes in rheumatoid arthritis patients attaining different disease activity states with methotrexate monotherapy and infliximab plus methotrexate: the impacts of remission and tumour necrosis factor blockade. *Annals of the rheumatic diseases.* 2009; 68(6): 823-7.

163.- Wiens A, Correr CJ, Venson R, Grochocki MC, Otuki MF, Pontarolo R. A meta-analysis of the efficacy and safety of using infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology.* 2009; 28(12): 1365-73.

164.- Ficha Técnica-Enbrel<sup>®</sup>.EMA.[www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)

165.- Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst a D, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England journal of medicine.* 1999; 340(4): 253-9.

166.- Bathon JM GM. The Early Rheumatoid Arthritis (ERA) trial comparing the efficacy and safety of etanercept and methotrexate. *Clin Exp Rheumato.* 21(5 Suppl 31): 195-7.

167.- Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; 363(9410): 675-81.

168.-Ficha Técnica-Humira<sup>®</sup>. EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)

169.- Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis and rheumatism.* 2006; 54(1): 26-37.

170.- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Kavanaugh a F, Chartash EK, Segurado OG. Long term efficacy and safety of adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4 year extended study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2006; 65(6): 753-9.

171.- Furst DE, Schiff MH, Fleischmann RM, Strand V, Birbara CA, Compagnone D, Fischkoff SA, Chartash EK. Adalimumab, a fully human anti tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). *J Rheumatol.* 2003; 30(12): 2563-71.

172.- Ficha Técnica-Simponi<sup>®</sup>.EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)

173.- Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, et al. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2009; 68(6): 789-96.

- 174.- Emery P, Fleischmann RM, Moreland LW, Hsia EC, Strusberg I, Durez P, et al. Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-bli. *Arthritis and rheumatism*. 2009; 60(8): 2272-83.
- 175.- Smolen JS, Kay J, Doyle MK, Landewé R, Matteson EL, Wollenhaupt J, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet*. 2009; 374(9685): 210-21.
- 176.- Ficha Técnica-Cimzia®. EMA.[www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)
- 177.- Keystone E, Heijde DVD, Mason D, Landewé R, Vollenhoven RV, Combe B, et al. Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 58(11): 3319-29.
- 178.- Smolen J, Landewé RB, Mease P, Brzezicki J, Mason D, Lijntens K, et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009 J; 68(6): 797-804.
- 179.- Fleischmann R, Vencovsky J, van Vollenhoven RF, Borenstein D, Box J, Coteur G, et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(6): 805-11.
- 180.-Aaltonen KJ, Virkki LM, Malmivaara A, Konttinen YT, Nordström 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(1): e30275.
- 181.- Rodríguez Lozano C. Seguridad de las terapias biológicas: nuevos datos de BIOBADASER. *Reumatol Clin*. 2011; 06 (Supl.3):1-6.
- 182.- Carmona L, Gómez-Reino J, González-González R; en representación del Grupo de Estudio BIOBADASER. Spanish registry of adverse events of biological therapies in rheumatic diseases (BIOBADASER): report as of January 14, 2005. *Reumatol Clin*. 2005; 1(2): 95-111.
- 183.- Carmona L, Descalzo M a, Ruiz-Montesinos D, Manero-Ruiz FJ, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ. Safety and retention rate of off-label uses of TNF antagonists in rheumatic conditions: data from the Spanish registry BIOBADASER 2.0. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011; 50(1): 85-92.
- 184.- Pérez-Sola MJ, Torre-Cisneros J, Pérez-Zafrilla B, Carmona L, Descalzo MA G-RJBSG. Infections in patients treated with tumor necrosis factor antagonists: incidence, etiology and mortality in the BIOBADASER registry. *Med Clin (Barc)*. 2011; 137(12): 533-40.
- 185.- Doubrawa E, Ricca RA, Malucelli TO, Dal Pizzol VI, Barros DH, Paiva ES. Use of infliximab in a patient with rheumatoid arthritis and chronic hepatitis B. *Rev Bras Reumatol*. 2012; 52(4): 653-655.
- 186.- Marie I, Guglielmino E. Non tuberculous anti-TNF associated opportunistic infections. *Rev Med Interne*. 2010; 31(5): 353-60.
- 187.- Peña-Sagredo JL, Hernández MV, Fernandez-Llanio N, Giménez-Ubeda E, Muñoz-Fernandez S, Ortiz A, et al. Listeria monocytogenes infection in patients with rheumatic diseases on TNF-alpha antagonist therapy: the Spanish Study Group experience. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(5): 854-9.
- 188.- J. Peña-Sagredo, M. Fariñas, B. Pérez-Zafrilla, A. Cruz-Valenciano, M. Crespo, B. Joven-Ibañez, et al. Non-Typhi Salmonella infection in patients with rheumatic diseases on TNF-alpha antagonist

therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27(6): 920-5.

189.- Fonseca JE, Lucas H, Canhão H, Duarte R, Santos MJ, Villar M, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of latent and active tuberculosis in patients with inflammatory joint diseases treated with tumour necrosis factor alpha inhibitors. *Acta Reumatol Port*. 2006; 31(3): 237-45

190.- Gómez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis and rheumatism*. 2003; 48(8): 2122-7.

191.- Gómez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis and rheumatism*. 2007; 57(5): 756-61.

192.- Alonso Ruiz A. Infections in Patients With Rheumatoid Arthritis Undergoing Anti-TNF $\alpha$  Drug Therapy. *Reumatol Clin*. 2008; 4S2: 18-23.

193.-Carmona L, Abasolo L, Descalzo M a, Pérez-Zafrilla B, Sellas A, de Abajo F, et al. Cancer in patients with rheumatic diseases exposed to TNF antagonists. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2011; 41(1): 71-80.

194.- Askling J, Baecklund E, Granath F, Geborek P, Fored M, Backlin C, et al. Anti-tumour necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis and risk of malignant lymphomas: relative risks and time trends in the Swedish Biologics Register. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(5): 648-53.

195.- Mariette X, Tubach F, Bagheri H, Bardet M, Berthelot JM, Gaudin P, et al. Lymphoma in patients treated with anti-TNF: results of the 3-year prospective French RATIO registry. *Ann Rheum Dis*. 2010 Feb;69(2): 400-8.

196.- Ficha Técnica-Mabthera<sup>®</sup>. EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/).

197.- Mease PJ, Revicki DA, Szechinski J, Greenwald M, Kivitz A, Barile-Fabris L, Kalsi J, Eames J, Leirisalo-Repo M. Improved health-related quality of life for patients with active rheumatoid arthritis receiving rituximab: Results of the Dose-Ranging Assessment: International Clinical Evaluation of Rituximab in Rheumatoid Arthritis (DANCER) Trial. *J Rheumatol*. 2008; 35(1): 20-30.

198.- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie R a, Genovese MC, 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 and rheumatism*. 2006; 54(9): 2793-806.

199.-Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth a, Peterfy CG, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70(1): 39-46.

200.- Ficha Técnica-Orencia<sup>®</sup>. EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)

201.- Westhovens R, Robles M, Ximenes a C, Nayiager S, Wollenhaupt J, Durez P, et al. Clinical efficacy and safety of abatacept in methotrexate-naive patients with early rheumatoid arthritis and poor prognostic factors. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(12): 1870-7.

202.- Bathon J, Robles M, Ximenes a C, Nayiager S, Wollenhaupt J, Durez P, et al. Sustained disease remission and inhibition of radiographic progression in methotrexate-naive patients with rheumatoid arthritis and poor prognostic factors treated with abatacept: 2-year outcomes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70(11): 1949-56.

203.- Ficha Técnica-Kineret<sup>®</sup>. EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)



- 204.- Cohen SB, Rubbert a. Bringing the clinical experience with anakinra to the patient. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2003; 42 Suppl 2: ii36-40.
- 205.- Botsios C, Sfriso P, Furlan A, Ostuni P, Biscaro M, Fiocco U, et al. Anakinra , antagonista umana ricombinante del recettore dell ' IL-1, nella pratica clinica . Anakinra , a recombinant human IL-1 receptor antagonist , in clinical practice . Outcome in 60 patients with severe rheumatoid arthritis. *L. Health (San Francisco)*. 2007; 59(1): 32-7.
- 206.- Ficha Técnica-RoActemra<sup>®</sup>. EMA. [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/).
- 207.- Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Bröll J, Balint G, 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 and rheumatism*. 2006; 54(9): 2817-29.
- 208.- Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 2008; 371(9617): 987-97.
- 209.- Hashimoto J, Garnerio P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, et al. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiograp. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2011; 21(1): 10-5.
- 210.- Jones G, Sebba a, Gu J, Lowenstein MB, Calvo a, Gomez-Reino JJ, et al. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(1): 88-96.
- 211.- Tornero Molina J, Sanmartí Sala R, Rodríguez Valverde V, Martín Mola E, Marengo de la Fuente JL, González Álvaro I, et al. Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis. *Reumatología clínica*. 2010; 6(1): 23-36.
- 212.- Verstappen SM, Jacobs JW, Huisman AM, van Rijthoven AW, Sokka T, Bijlsma JW. Functional Health Assessment Questionnaire (HAQ) and Psychological HAQ Are Associated with and Predicted by Different Factors in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2007; 34(9): 1837-40.
- 213.- Linde L, Sørensen J, Ostergaard M, Hørslev-Petersen K, Hetland ML. Health-related quality of life: validity, reliability, and responsiveness of SF-36, 15D, EQ-5D [corrected] RAQoL, and HAQ in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2008; 35(8): 1528-37.
- 214.- Porter D, Gadsby K, Thompson P, White J, McClinton C, Oliver S. DAS28 and Rheumatoid Arthritis: The Need for Standardization. *Musculoskeletal care*. 2011;9(4): 222-7.
- 215.- Heijde D, Theunisse LAM. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis : first step in the development. *Extrapolation*. 1990;(January): 916–20.
- 216.- Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM, Jasani MK, Dalakos TG, Grieverson P BW. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med*. 1968; 37(147): 393-406.
- 217.- Fransen J, Langenegger T, Michel B a, Stucki G. Feasibility and validity of the RADAI, a self-administered rheumatoid arthritis disease activity index. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2000; 39(3): 321-7.

- 218.- Wells G, Becker J-C, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, et al. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythr. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(6): 954-60.
- 219.- Smolen JS. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*. 2003; 42(2): 244-57.
- 220.- Eberl G, Studnicka-Benke a, Hitzelhammer H, Gschnait F, Smolen JS. Development of a disease activity index for the assessment of reactive arthritis (DAREA). *Rheumatology (Oxford, England)*. 2000; 39(2):148-55.
- 221.- Aletaha D, Smolen JS. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) to monitor patients in standard clinical care. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2007; 21(4): 663-75.
- 222.- Felson D. Defining remission in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012; 71 Suppl 2(Suppl II): i86-8.
- 223.- Tugwell P, Boers M, Baker P, Wells G SJ. Endpoints in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994; 21(42): 2-8.
- 224.- RS. R. Pooled outcome measures in arthritis: the pros and cons. *J Rheumatol*. 1993; 20(3): 566-7.
- 225.- Balsa A. ¿Cómo se evalúa una respuesta inadecuada en un paciente con artritis reumatoide en la práctica clínica? *Reumatología clinica*. 2007; 2(1): 38-44.
- 226.- Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB van RP. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Cri. *Arthritis Rheum*. 1996; 39(1): 34-40.
- 227.- Rheum. A. Analysis of improvement in individual rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs, based on the findings in patients treated with placebo. The Co-operative Systematic Studies of Rheumatic Diseases Groupe. *Arthritis Rheum*. 1990; 33(4): 477-84.
- 228.- Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, Katz LM, Lightfoot R Jr, Paulus H, Strand V et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995; 38(6): 727-35.
- 229.- Burmester GR, Ferraccioli G, Flipo R-M, Monteagudo-Sáez I, Unnebrink K, Kary S, et al. Clinical remission and/or minimal disease activity in patients receiving adalimumab treatment in a multinational, open-label, twelve-week study. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 59(1): 32-41.
- 230.- Cui J, Saevardsdottir S, Thomson B, Padyukov L, Mil AHMVDH-van, Nititham J, et al. Rheumatoid Arthritis Risk Allele PTPRC Is Also Associated With Response to Anti – Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Therapy. *Arthritis & Rheumatism*. 2010; 62(7): 1849-61.
- 231.- Hyrich KL, Watson KD, Silman a J, Symmons DPM. Predictors of response to anti-TNF-alpha therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006; 45(12): 1558-65.
- 232.- Mancarella L, Bobbio-Pallavicini F, Ceccarelli F, Falappone PC, Ferrante A, Malesci D, et al. Good clinical response, remission, and predictors of remission in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor-alpha blockers: the GISEA study. *The Journal of rheumatology*. 2007; 34(8): 1670-3.

- 233.- Forslind K, Hafström I, Ahlmén M, Svensson B. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Annals of the rheumatic diseases*. 2007; 66(1): 46-52.
- 234.- Ahlmén M, Svensson B, Albertsson K, Forslind K, Hafström I. Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(1): 230-3.
- 235.- Jawaheer D, Olsen J, Hetland ML. Sex differences in response to anti-tumor necrosis factor therapy in early and established rheumatoid arthritis results from the DANBIO registry. *J Rheumatol*. 2012; 39(1): 46-53.
- 236.- 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 and rheumatism*. 1999; 42(5): 910-7.
- 237.- Masdottir B, Jónsson T, Manfredsdottir V, Víkingsson a, Brekkan a, Valdimarsson H. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2000; 39(11): 1202-5.
- 238.- Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001; 60(3): 223-7.
- 239.- Matthey DL, Dawes PT, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Thomson W, et al. Relationship among the HLA-DRB1 shared epitope, smoking, and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002; 47(4): 403-7.
- 240.- Westhoff G, Rau R, Zink a. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008; 47(6): 849-54.
- 241.- Matthey DL, Brownfield A, Dawes PT. Relationship between pack-year history of smoking and response to tumor necrosis factor antagonists in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2009; 36(6): 1180-7.
- 242.- Haraoui B, Cameron L, Ouellet M, White B. Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *The Journal of rheumatology*. 2006; 33(1): 31-6.
- 243.- Cozen W, Diaz-Sanchez D, James Gauderman W, Zadnick J, Cockburn MG, Gill PS, et al. Th1 and Th2 cytokines and IgE levels in identical twins with varying levels of cigarette consumption. *Journal of clinical immunology*. 2004; 24(6): 617-22.
- 244.- Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006; 45(10): 1223-9.
- 245.- Saevarsdottir S, Wedre S, Seddighzadeh M, Bengtsson C, Wesley A, Lindblad S, et al. Patients With Early Rheumatoid Arthritis Who Smoke Are Less Likely to Respond to Treatment With Methotrexate and Tumor Necrosis Factor Inhibitors Observations From the Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis and the Swedish Rheumatology Regi. *Arthritis & Rheumatism*. 2011; 63(1): 26-36.
- 246.- Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gülfe a, Söderlin M, Saxne T, Geborek P. Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008; 47(4): 495-9.

- 247.- van der Heijde D, Klareskog L, Landewé R, Bruyn GA, Cantagrel A, Durez P et al. Disease remission and sustained halting of radiographic progression with combination etanercept and methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(12): 3928-39.
- 248.- Vázquez I, Graell E, Gratacós J, Cañete JD, Viñas O, Ercilla MG, et al. Prognostic markers of clinical remission in early rheumatoid arthritis after two years of DMARDs in a clinical setting. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25(2): 231-8.
- 249.- Gossec L, Dougados M, Goupille P, Cantagrel a, Sibilía J, Meyer O, et al. Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2004; 63(6): 675-80.
- 250.- Verstappen SMM, van Albada-Kuipers G a, Bijlsma JWJ, Blaauw a a M, Schenk Y, Haanen HCM, et al. A good response to early DMARD treatment of patients with rheumatoid arthritis in the first year predicts remission during follow up. *Annals of the rheumatic diseases.* 2005; 64(1): 38-43.
- 251.- Listing J, Strangfeld A, Rau R, Kekow J, Gromnica-Ihle E, Klopsch T, et al. Clinical and functional remission: even though biologics are superior to conventional DMARDs overall success rates remain low results from RABBIT, the German biologics register. *Arthritis research & therapy.* 2006; 8(3): R66.
- 252.- Keystone E, Freundlich B, Schiff M, Li J, Hooper M. Patients with moderate rheumatoid arthritis (RA) achieve better disease activity states with etanercept treatment than patients with severe RA. *The Journal of rheumatology.* 2009; 36(3): 522-31.
- 253.- Bathon JM, Genovese MC. The Early Rheumatoid Arthritis (ERA) trial comparing the efficacy and safety of etanercept and methotrexate. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21(5 Suppl 31): S195-7.
- 254.- Aletaha D, Funovits J, Keystone EC, Smolen JS. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism.* 2007; 56(10): 3226-35.
- 255.- Liang GC, Cordero M, Dyer A, Chang RW. probability of remissions in patients with rheumatoid arthritis . Current Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitor Use Is Associated with a Higher Probability of Remissions in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Rheumatology.* 2005; 32(9): 4-8.
- 256.- Potter C, Hyrich KL, Tracey a, Lunt M, Plant D, Symmons DPM, et al. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2009; 68(1): 69-74.
- 257.- Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, Avalle S, Epis OM, Klersy C, et al. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2007; 66(3): 302-7.
- 258.- Fisher B a, Plant D, Lundberg K, Charles P, Barton A, Venables PJ. Heterogeneity of Anticitrullinated Peptide Antibodies and Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Agents in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology.* 2012; 39(5): 929-32.
- 259.- Matsudaira R, Tamura N, Sekiya F, Ogasawara M, Yamanaka K, Takasaki Y. Anti-Ro/SSA Antibodies Are an Independent Factor Associated with an Insufficient Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology.* 2011; 38(11): 2346-54.
- 260.- González-Alvaro I, Ortiz AM, Tomero EG, Balsa A, Orte J, Laffon A, García-Vicuña R. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(12): 1675-8.

- 261.- Trocmé C, Marotte H, Baillet A, Pallot-Prades B, Garin J, Grange L, Miossec P, Tebib J, Berger F, Nissen MJ, Juvin R, Morel F, Gaudin P. Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(8): 1328-33
- 262.- Marotte H, Arnaud B, Diasparra J, Zrioual S, Miossec P. Association between the level of circulating bioactive tumor necrosis factor alpha and the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism at -308 in patients with rheumatoid arthritis treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Arthritis and rheumatism*. 2008; 58(5):1258-63.
- 263.- Marotte H, Maslinski W, Miossec P. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis research & therapy*. 2005; 7(1): R149-55.
- 264.- Chen D-Y, Chen Y-M, Chen H-H, Hsieh C-W, Lin C-C, Lan J-L. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis research & therapy*. 2011; 13(4): R126.
- 265.- Alzabin S, Abraham SM, Taher TE, Palfreeman A, Hull D, McNamee K, Jawad A, Pathan E, Kinderlerer A, Taylor PC, Williams R, Mageed R. Incomplete response of inflammatory arthritis to TNF $\alpha$  blockade is associated with the Th17 pathway. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71(10): 1741-8.
- 266.- Weyand CM, Goronzy JJ, Takemura S, Kurtin PJ. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. 2000; 2(6): 457-63.
- 267.- Cañete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmartí R, et al. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(5): 751-6.
- 268.- Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis and rheumatism*. 2011; 63(9): 2575-83.
- 269.- Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 538-49
- 270.- Krintel SB, Palermo G, Johansen JS, Germer S, Essioux L, Benayed R, et al. Investigation of single nucleotide polymorphisms and biological pathways associated with response to TNF $\alpha$  inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics*. 2012; 22(8): 577-89.
- 271.- Emery P, Dörner T. Optimising treatment in rheumatoid arthritis: a review of potential biological markers of response. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(12): 2063-70.
- 272.- Cuchacovich M, Ferreira L, Aliste M, Soto L, Cuenca J, Cruzat a, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and influence of -308 TNF-alpha promoter polymorphism on the responsiveness to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2004; 33(4): 228-32.
- 273.- Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, Reviron D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2003; 48(7): 1849-52.
- 274.- Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Montes de Oca JV, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *Journal of autoimmunity*. 2005; 24(1): 63-8.

- 275.- Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Sandooghi M, Mohajer F. Tumour necrosis factor  $\alpha$  -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2007; 28(2): 189-91.
- 276.- Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, Ernestam S, Cederholm T, Lundkvist I, et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(6): 526-9.
- 277.- Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Human molecular genetics*. 2008; 17(22): 3532-8.
- 278.- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association of TNF- $\alpha$  -308 G/A polymorphism with responsiveness to TNF- $\alpha$ -blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology international*. 2006; 27(2): 157-61.
- 279.- O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope a, Rahman P. TNF- $\alpha$ -308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF- $\alpha$  blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *The pharmacogenomics journal*. 2009; 9(3): 161-7.
- 280.- Pavy S, Toonen EJM, Miceli-Richard C, Barrera P, van Riel PLCM, Criswell L, et al. Tumour necrosis factor  $\alpha$  -308G->A polymorphism is not associated with response to TNF $\alpha$  blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(6): 1022-8.
- 281.- Lee YH, Ji JD, Bae SC, Song GG. Associations between tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) -308 and -238 G/A polymorphisms and shared epitope status and responsiveness to TNF- $\alpha$  blockers in rheumatoid arthritis: a metaanalysis update. *J Rheumatol*. 2010; 37(4): 740-6.
- 282.- Kang CP, Lee KW, Yoo DH, Kang C, Bae SC. The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor  $\alpha$  gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2005; 44(4): 547-52.
- 283.- Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C, Tamouza R, Loiseau P, Ravaud P, Kupper H, et al. A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67(4): 478-84.
- 284.- Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Carreira-García V, Blanco FJ. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. *Reumatología clínica*. 2009; 5(6): 268-79.
- 285.- Martínez A, Salido M, Bonilla G, Pascual-Salcedo D, Fernández-Arquero M, de Miguel S, et al. Association of the major histocompatibility complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50(4): 1077-82.
- 286.- Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Tebib J, Gaudin P, Alexandre C, et al. The shared epitope is a marker of severity associated with selection for, but not with response to, infliximab in a large rheumatoid arthritis population. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006; 65(3): 342-7.
- 287.- Toonen EJM, Coenen MJH, Kievit W, Fransen J, Eijsbouts a M, Scheffer H, et al. The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T>G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008; 67(8): 1174-7.
- 288.- Criswell L a, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J, et al. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis and rheumatism*. 2004; 50(9): 2750-6.

- 289.- Engelmann R, Eggert M, Neeck G, Mueller-Hilke B. The impact of HLA-DRB alleles on the subclass titres of antibodies against citrullinated peptides. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(10): 1862-6.
- 290.- Plant D, Prajapati R, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Barton A. Replication of association of the PTPRC gene with response to anti-tumor necrosis factor therapy in a large UK cohort. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(3): 665-70
- 291.- Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, et al. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet*. 2009; 41(12): 1313-8.
- 292.- Potter C, Cordell HJ, Barton A, Daly AK, Hyrich KL, Mann D a, et al. Association between anti-tumour necrosis factor treatment response and genetic variants within the TLR and NF{kappa}B signalling pathways. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(7): 1315-20.
- 293.- Hassan B, Maxwell JR, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, et al. Genotype at the sIL-6R A358C polymorphism does not influence response to anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* . 2010; 49(1): 43-7.
- 294.- Frazer K a, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature reviews. Genetics*. 2009; 10(4): 241-51.
- 295.- Spencer CC a, Su Z, Donnelly P, Marchini J. Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. *PLoS genetics*. 2009; 5(5): e1000477.
- 296.- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Res*. 2005; 15(11): 1592-3
- 297.- Visscher PM, Brown M a, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *American journal of human genetics*. 2012; 90(1): 7-24.
- 298.- Rueda B, Orozco G, Sánchez E, Oliver J, Martín J. Common genetic factors in autoimmunity. *Reumatología clínica*. 2008; 4S1: 1-4.
- 299.- Stahl E a, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics*. 2010; 42(6): 508-14.
- 300.- Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nature reviews. Genetics*. 2009; 10(1): 43-55.
- 301.- Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS genetics*. 2009; 5(1): e1000322.
- 302.- Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2005; 76(4): 561-71.
303. - Ji JD, Lee WJ, Kong KA, Woo JH, Choi SJ, Lee YH, Song GG. Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010; 37(1):141-7.
- 304.- Agarwal SK, Reveille JD. The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(2): 133-8.

- 305.- Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev.* 2012; 11(4): 281-7.
- 306.- Scharl M, Mwinyi J, Fischbeck A, Leucht K, Eloranta JJ, Arikkat J, et al. Crohn's disease-associated polymorphism within the PTPN2 gene affects muramyl-dipeptide-induced cytokine secretion and autophagy. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(5): 900-12.308.
- 307.- Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillén L, Rojas-Villarraga A, Deshmukh H, et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(2): 323-9.
- 308.- Zhernakova A, Stahl EA, Trynka G, Raychaudhuri S, Festen EA, Franke L, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet.* 2011; 7(2): e1002004.
- 309.- Bowes J, Ho P, Flynn E, Ali F, Marzo-Ortega H, Coates LC, et al. Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(8): 1350-4.
- 310.- Eyre S, Hinks A, Bowes J, Flynn E, Martin P, Wilson AG, et al. Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(5): R175.
- 311.- Maksymowych WP, Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: where are we at currently, and how do they compare? *Clin Exp Rheumatol.* 2009; 27(4 Suppl 55): S20-5.
- 312.- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-yue, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308(5720): 385-9.
- 313.- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007; 447(7145): 661-78.
- 314.- Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007; 39(12):1477-82.
- 315.- Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357(12): 1199-209.
- 316.- Julià A, Ballina J, Cañete JD, Balsa A, Tornero-Molina J, Naranjo A, et al. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in the Spanish population: KLF12 as a risk locus for rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis and rheumatism.* 2008; 58(8): 2275-86.
- 317.-Eyre S, Flynn E, Martin P, Hinks A, Wilson AG, Morgan AW, et al. No evidence for association of the KLF12 gene with rheumatoid arthritis in a large UK cohort. *Annals of the rheumatic diseases.* 2010; 69(7): 1407-8.
- 318.-García-Bermúdez M, López-Mejías R, Rodríguez-Rodríguez L, Fernández-Gutierrez B, García A, Raya E, et al. No evidence of association of the KLF12 gene with rheumatoid arthritis in Spanish and Dutch cohorts and a meta-analysis of published data. *Hum Immunol.* 2011; 72(9): 779-82
- 319.- Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007; 357(10): 977-86.
- 320.- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2008; 40(10): 1216-23.
- 321.- Stahl E a, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide asso-



ciation study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics*. 2010; 42(6): 508-14.

322.- Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu E, Elaine F, Kastner DL, et al. REL, a member of the NF- $\kappa$ B family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. 2010; 41(7): 820-3.

323.- Morgan AW, Robinson JI, Conaghan PG, Martin SG, Hensor EMA, Morgan MD, et al. Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 and TRAF1/C5 in an inception cohort. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(2): R57.

324.- Liu C, Batliwalla F, Li W, Lee A, Roubenoff R, Beckman E, et al. Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2008; 14(9-10): 575-81.

325.- Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, et al. Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci. *Arthritis and rheumatism*. 2011; 63(3): 645-53.

326.- Suarez-Gestal M, Perez-Pampin E, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Lack of replication of genetic predictors for the rheumatoid arthritis response to anti-TNF treatments: a prospective case-only study. *Arthritis research & therapy*. 2010; 12(2): R72.

327.- Devlin B, Roeder K, Wasserman L. Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theor Popul Biol*. 2001; 60(3): 155-66.

328.- Steemers FJ, Gunderson KL. Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(7): 777-82

329.- Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol*. 2009; 578: 245-54

330.- Shen R, Fan J-B, Campbell D, Chang W, Chen J, Doucet D, et al. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutation research*. 2005; 573 (1-2): 70-82.

331.- Pongpanich M, Sullivan PF, Tzeng J-Y. A quality control algorithm for filtering SNPs in genome-wide association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010; 26(14): 1731-7.

332.- Moskvina V, Craddock N, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC. Effects of differential genotyping error rate on the type I error probability of case-control studies. *Human heredity*. 2006; 61(1): 55-64.

333.- Llorca J, Onofre P-salceda, Dierssen-sotos T, Berciano J. Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg y enfermedades. 2005; 19(4): 321-4.

334.- Wang J, Shete S. Testing Hardy-Weinberg proportions in a frequency-matched case-control genetic association study. *PloS one*. 2011; 6(11): e27642.

335.- Tiwari HK, Barnholtz-Sloan J, Wineinger N, Padilla M a., Vaughan LK, Allison DB. Review and Evaluation of Methods Correcting for Population Stratification with a Focus on Underlying Statistical Principles. *Human Heredity*. 2008; 66(2): 67-86.

336.- Wu C, DeWan A, Hoh J, Wang Z. A comparison of association methods correcting for population stratification in case-control studies. *Ann Hum Genet*. 2011; 75(3): 418-27

337.- Li Q, Yu K. Improved correction for population stratification in genome-wide association studies by identifying hidden population structures. *Genetic epidemiology*. 2008; 32(3): 215-26.

338.- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M a R, Bender D, et al. PLINK: a tool set

for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 2007; 81(3): 559-75.

339. Dudbridge F, Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genetic epidemiology*. 2008; 32(3): 227-34.

340.-Turner S, Armstrong LL, Bradford Y, Carlson CS, Crawford DC, Crenshaw AT, et al. Quality control procedures for genome-wide association studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2011; Ed: Jhon Willey & Sons, Inc; Chapter 1: Unit 1.19.

341.- Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genetic epidemiology*. 2010; 34(8): 816-34.

342.- Wang K, Li M, Bucan M. Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies. *American journal of human genetics*. 2007; 81(6):1278-83.

343.- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, et al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*. 2007; 447(7145): 655-60.

344.- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos T a, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nature genetics*. 2001; 29(3): 306-9.

345.- Libioulle C, Bours V. Complex diseases: the importance of genetics. *Rev Med Liege*. 2012; 67 (5-6): 220-5.

346.- Li Y, Willer C, Sanna S, Abecasis G. Genotype imputation. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009;10: 387-406.

347.-Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature Publishing Group*. 2010; 11(7): 499-511

348.- Mewar D, Wilson AG. Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *British journal of pharmacology*. 2011; 162(4): 785-91.

349.- Nacci F, Matucci-Cerinic M. Tuberculosis and other infections in the anti-tumour necrosis factor-alpha (anti-TNF- $\alpha$ ) era. *Best practice & research. Clinical rheumatology [Internet]*. 2011; 25(3): 375-88.

350.- Askling J, van Vollenhoven RF, Granath F, Raaschou P, Forede CM, Baecklund E, et al. Cancer risk in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-tumor necrosis factor alpha therapies: does the risk change with the time since start of treatment? *Arthritis and rheumatism [Internet]*. 2009; 60(11): 3180-9.

351.- Gómez Rodríguez N. " Repercusión socioeconómica de la Artritis Reuatoide". *Anales de Medicina Interna (Madrid)*. 2003; 20 (3): 111-113.

352.- Curtis JR, Jain A, Askling J, Bridges L, Carmona L, Finckh A, et al. A comparison of patient characteristics and outcomes in selected European and U.S. rheumatoid arthritis registries. *Semin Arthritis Rheum*. 2010; 40(1):2-14.

353.- Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ SD. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Societiz for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(9): 2905-12.

354.- Elkayam O, Pavelka K. Biologic registries in rheumatology: Lessons learned and expectations for the future. *Autoimmunity reviews*. 2012 [Epub ahead of print]Pubmed PMID:22683382.

355.- Listing J, Stragfeld A, Rau R, Kekow J, Gromnica-Ihle E, Klopsch T et al. No Title. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(3): R66.

356.- Jönsson B, Kobelt G, Smolen J. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: uptake of new therapies. *The European journal of health economics: HEPAC: health economics in prevention and care [Internet].* 2008; 8 Suppl 2: S61-86.

357.- Sanmartí R, Gómez-Puerta J a. [Biomarkers in rheumatoid arthritis]. *Reumatología clínica [Internet].* 2011; 6S3: S25-8.

358.- Van Venrooij WJ, Vossenaar ER ZA. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *arthritis. Autoimmun Rev.* 2004; 3(1): S17-9.

359.- Whiting PF, Smidt N, Sterne JA, Harbord R, Burton A, Burke M BR, Ben-Shlomo Y, Axford J DP. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated Peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2010; 152(7): 456-64.

360.- Atzeni F, Antivalle M, Pallavicini FB, Caporali R, Bazzani C, Gorla R, et al. Predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity reviews [Internet].* 2009; 8(5): 431-7.

361.- Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U, Dreyer L, Hansen A, Hansen IT, et al. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish. *Arthritis and rheumatism [Internet].* 2010; 62(1): 22-32.

362.- Kievit W, Adang EM, Fransen J, Kuper HH, van de Laar M a FJ, Jansen TL, et al. The effectiveness and medication costs of three anti-tumour necrosis factor alpha agents in the treatment of rheumatoid arthritis from prospective clinical practice data. *Annals of the rheumatic diseases [Internet].* 2008; 67(9):1229-34.

363.- Singh J a, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying anti-rheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis care & research [Internet].* 2012; 64(5): 625-39.

364.- Deighton C. The updated BSR guidelines for anti-TNF in adults with RA: what has changed and why? *Musculoskeletal care [Internet].* 2005; 3(3): 122-30.

365.- Gartlehner G, Hansen R a, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *The Journal of rheumatology [Internet].* 2006; 33(12): 2398-408.

366.- Hochberg MC, Tracy JK, Flores RH. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor. 2003;:13-6.

367.- Lee YH, Woo JH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Meta-analysis of the combination of TNF inhibitors plus MTX compared to MTX monotherapy, and the adjusted indirect comparison of TNF inhibitors in patients suffering from active rheumatoid arthritis. *Rheumatology international [Internet].* 2008; 28(6): 553-9.

368.- Geborek P, Crnkic M, Petersson IF, Saxne T. Etanercept, infliximab, and leflunomide in established rheumatoid arthritis: clinical experience using a structured follow up programme in southern Sweden. *Annals of the rheumatic diseases.* 2002; 61(9): 793-8.

369.- Schiff M, Keiserman M, Coddling C, Songcharoen S, Berman a, Nayiager S, et al. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to

methotrexate. *Annals of the rheumatic diseases* [Internet]. 2008; 67(8): 1096-103.

370.- Gabay Cem, Emery Paul, van Vollenhoven Ronald, Dikranian Ara, Alten Rieke KM et al. Tocilizumab monotherapy is superior to adalimumab monotherapy in reducing disease activity in patients with rheumatoid arthritis: 24-Week data from the phase 4 ADACTA trial (abstract). *Ann Rheum Dis*.

371.- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Frisch M. Socioeconomic status and risk of rheumatoid arthritis: a Danish case-control study. *The Journal of rheumatology*. 2006; 33(6): 1069-74.

372.- Bengtsson C, Nordmark B, Klareskog L, Lundberg I, Alfredsson L. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Annals of the rheumatic diseases* [Internet]. 2005; 64(11): 1588-94.

373.- Socioeconomic deprivation and rheumatoid disease: What lessons for the health service?. ERAS Study Group. *Early Rheumatoid Arthritis Study*. *Ann Rheum Dis*. 2000;59 (10): 794-9.

374.- Söderlin MK, Petersson IF, Geborek P. The effect of smoking on response and drug survival in rheumatoid arthritis patients treated with their first anti-TNF drug. *Scand J Rheumatol*. 2012; 41(1): 1-9.

375.- Abhishek a, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Deighton CM. Anti-TNF-alpha agents are less effective for the treatment of rheumatoid arthritis in current smokers. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2010; 16(1): 15-8.

376.- Petrescu F, Cosmin Voican S, Silosi I. Tumor necrosis factor- $\alpha$  serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010; 5: 217-22.

377.- Diez Pina JM, Fernandez-Aceñero MJ, Llorento-Alonso MJ, Diaz-Lobato S, Mayoralas S, Florez A. Tumor necrosis factor alpha as marker of systemic and local inflammation in "healthy" smoker. *Int J Gen Med*. 2009; 2: 9-14

378.- Bathon J, Martin R, Fleischmann R, Tesser J, Schiff M, Keystone E, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2000; 343 (22): 1586-1593

379.- Potter C, Hyrich KL, Tracey a, Lunt M, Plant D, Symmons DPM, et al. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumor necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009; 68(1): 69-74.

380.- Kuriya B, Sun Y, Boire G, Haraoui B, Hitchon C, Pope JE, et al. Remission in early rheumatoid arthritis - a comparison of new ACR/EULAR remission criteria to established criteria. *The Journal of rheumatology*. 2012; 39(6): 1155-8.

381.- Forslind K, Hafström I, Ahlmén M, Svensson B. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Annals of the rheumatic diseases*. 2007; 66(1): 46-52.

382.- Dubinsky MC, Mei L, Friedman M, Dhere T, Haritunians T, Hakonarson H, et al. Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNF $\alpha$  therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16(8):1357-66.

383.- Wang J, Bansal AT, Martin M, Germer S, Benayed R, Essioux L, et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J*. 2012 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22491018.

384.- Fortier JM, Kornbluth J. NK lytic-associated molecule, involved in NK cytotoxic function, is an E3 ligase. *J Immunol*. 2006; 176(11): 6454-63.

- 384.- Sternlicht M, Werb Z . How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Biol.* 2001; 17: 463-516.
- 385.- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2002; 3(3): 207–14.
- 386.- Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS AE-SA. Variation of matrix metalloproteinase 1 and 3 haplotypes and their serum levels in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012; 16: 15–20.
- 387.- Chen Y MD. Age at onset of rheumatoid arthritis: association with polymorphisms in the vascular endothelial growth factor A(VEGFA) gene and an intergenic locus between matrix metalloproteinase (MMP)1 and 3 genes. *Clin Exp Rheumatol.* 2012.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22776467.
- 388.- Ye S, Patodi N, Walker-Bone K, Reading I, Cooper C, Dennison E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *International journal of immunogenetics.* 2007; 34(2): 81–5.
- 389.- Moss ML, Rasmussen FH. Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening. *Analytical biochemistry [Internet].* 2007 Jul 15 [cited 2012 Aug 18];366(2):144–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548045>
- 390.- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine.* 2008 Oct [cited 2012 Jul 15];29(5):258–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762209>
- 391.- Li H, Duhachek-Muggy S, Qi Y, Hong Y, Behbod F, Zolkiewska A. An essential role of metalloprotease-disintegrin ADAM12 in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 135(3): 759-69.
- 392.- Kerna I, Kisand K, Tamm AE, Lintrop M, Veske, Tamm AO. Missense single nucleotide polymorphism of the ADAM12 gene is associated with radiographic Knee osteoarthritis in middle-aged Estonian cohort. *Osteoarthritis Cartilage.*2009;17 (8): 1093-8.
- 393.- Limer KL, Tosh K, Bujac SR, McConnell R, Doherty S, Nyberg F et al. Attempt to replicate published genetic associations in a large, well-defined osteoarthritis case-control population (the Goal study). *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17(6): 782-9
- 394.- Nah SS, Lee S, Joo J, Kim HK, Sohn DR, Kwon JT, Woo KM, Hong SJ, Kim HJ. Association of ADAMTS12 polymorphisms with rheumatoid arthritis. *Mol Med Report.* 2012; 6(1): 227-31.
- 395.- Kling a, Seddighzadeh M, Arlestig L, Alfredsson L, Rantapää-Dahlqvist S, Padyukov L. Genetic variations in the serotonin 5-HT2A receptor gene (HTR2A) are associated with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases [Internet].* 2008; 67(8): 1111–5.
- 396.- Seidel MF, Fiebich BL, Ulrich-Merzenich G, Candelario-Jalil E, Koch F-W, Vetter H. Serotonin mediates PGE2 overexpression through 5-HT2A and 5-HT3 receptor subtypes in serum-free tissue culture of macrophage-like synovial cells. *Rheumatology international [Internet].* 2008; 28(10):1017-22.
- 397.- Kishi T, Yoshimura R, Fukuo Y, Okochi T, Matsunaga S, Umene-Nakano W, et al. The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22752684.
- 398.- Xu J, Zhang G, Cheng Y, Chen B, Dong Y, Li L, et al. Hypomethylation of the HTR1A promoter

region and high expression of HTR1A in the peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011; 20(7):678–89.

399.- Dickens C, McGowan L, Clark-Carter D, Creed F. Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosom Med* 2002; 64: 52-60.

400.- Hyrich K, Symmons D, Watson K, Silman A. Baseline comorbidity levels in biologic and standard DMARD treated patients with rheumatoid arthritis: results from a national patient register. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 895-8

401.- Hider SL, Tanveer W, Brownfield A, Matthey DL, Packham JC. Depression in RA patients treated with anti-TNF is common and under-recognized in the rheumatology clinic. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48(9): 1152-4.

402.- Ertenli I, Ozer S, Kiraz S, Apras SB, Akdogan A, Karadag O, et al. Infliximab, a TNF-alpha antagonist treatment in patients with ankylosing spondylitis: the impact on depression, anxiety and quality of life level. *Rheumatol Int*. 2012; 32(2): 323-30.

403.- Seidel MF. Local injections of serotonin type-3 receptor antagonists as a therapeutic option in rheumatology. *Future Med Chem*. 2012 Apr;4(6):705-7. PubMed PMID: 22530634.

404.- Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, et al. A Randomized Controlled Trial of the Tumor Necrosis Factor Antagonist Infliximab for Treatment-Resistant Depression: The Role of Baseline Inflammatory Biomarkers. *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 3:1-11. .

405.- Martinon F, Gaide O, Pétrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Seminars in immunopathology*. 2007; 29(3):213–29.

406.- Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual review of biochemistry* [Internet]. 2005; 74: 355–83.

407.- Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *The New England journal of medicine* [Internet]. 2007 22; 356(12): 1216-25.

408.- Hiller S, Kohl a, Fiorito F, Herrmann T, Wider G, Tschopp J, et al. NMR Structure of the Apoptosis- and Inflammation-Related NALP1 Pyrin Domain. *Structure* [Internet]. 2003; 11(10): 1199-205.

409.- Sui J, Li H, Fang Y, Liu Y, Li M, Zhong B, et al. NLRP1 gene polymorphism influences gene transcription and is a risk factor for rheumatoid arthritis in han chinese. *Arthritis and rheumatism* [Internet]. 2012; 64(3): 647-54.

410.- Church LD, Churchman SM, Hawkins PN, McDermott MF. Hereditary auto-inflammatory disorders and biologics. *Springer seminars in immunopathology*. 2006; 27(4):494–508.

411.- Cummings JRF, Cooney RM, Clarke G, Beckly J, Geremia a, Pathan S, et al. The genetics of NOD-like receptors in Crohn's disease. *Tissue antigens*. 2010; 76(1):48–56.

412.- Kastbom a, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G, Söderkvist P. Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008; 47(4): 415–7.

413.- Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics*. 2007; 39(2): 207–11.

414.- Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion*

in immunology. 2006; 18(1):39–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337366>

415.- Fiocco U, Sfriso P, Lunardi F, Pagnin E, Oliviero F, Scagliori E, et al. Molecular pathways involved in synovial cell inflammation and tumoral proliferation in diffuse pigmented villonodular synovitis. *Autoimmunity reviews*. 2010; 9(11):780–4.

416.- Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer research*. 2007; 67(3):1038–45.

417.- Korkosz M, Bukowska-Strakova K, Sadis S, Grodzicki T, Siedlar M. Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14(++)CD16(+)/CD14(+)CD16(++)) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood*. 2012; 119(22):5329–30.

418.- Turner AR, Guilbert LJ, Robert A, Guilbert J. Synergistic stimulation of macrophage proliferation by the monokines tumor necrosis factor-alpha and colony-stimulating factor 1. 1989; 73: 307–11.

419.- Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbin A, et al. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281(17):11846–55.

420.- Hamilton J a. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*. 2008; 8(7):533–44.

421.- Viatte S, Plant D, Bowes J, Lunt M, Eyre S, Barton A, et al. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012 Jun 1 [cited 2012 Aug 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661644>

422.- Gottardo L, De Cosmo S, Zhang YY, Powers C, Prudente S, Marescotti MC, et al. A polymorphism at the IL6ST (gp130) locus is associated with traits of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(1):205-10.

423.- Terra X, Auguet T, Quesada I, Aguilar C, Luna AM, Hernández M, et al. Increased levels and adipose tissue expression of visfatin in morbidly obese women: the relationship with pro-inflammatory cytokines. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(5):691-8.

424.- Zhou Z, Li CY, Li K, Wang T, Zhang B, Gao TW. Decreased methionine sulphoxide reductase A expression renders melanocytes more sensitive to oxidative stress: a possible cause for melanocyte loss in vitiligo. *The British journal of dermatology*. 2009; 161(3):504–9.

425.- Martín J-E, Alizadeh BZ, González-Gay M a, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Fernández-Gutiérrez B, et al. Identification of the oxidative stress-related gene MSRA as a rheumatoid arthritis susceptibility locus by genome-wide pathway analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2010; 62(11): 3183–90.

426.- García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Castañeda S, Miranda-Filloo J, Blanco R, et al. Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology [Internet]*. 2012 41(5): 350-3.

427.- Seki T, Selby J, Häupl T WR. Use of differential subtraction method to identify genes that characterize the phenotype of cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum*. 1998 Aug;41(8):1356-64.1998; 41(8): 1356–64.

428.- Hwang JR, Huh JH, Lee Y, Lee SI, Rho SB, Lee JH. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activity by binding to TNFR1. *Biochem Biophys Res Com-*

mun. 2011; 405(4): 545-51.

429.- Zhan Y, Xu Y, Lew AM. The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: more than a hematopoietic growth factor. *Molecular immunology*. 2012; 52(1):30-7.

430.- Hamilton J a. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends in immunology*. 2002 Aug;23(8):403-8.

430.- Burmester GR, Feist E, Sleeman M a, Wang B, White B, Magrini F. Mavrilimumab, a human monoclonal antibody targeting GM-CSF receptor- $\alpha$ , in subjects with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I, first-in-human study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011; 70(9):1542-9.

431.- Rothe M, Xiong J, Shu H-bing, Williamson K, Goddardt A, Goeddel DV. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. 1996; 93(August):8241-6.

432.- Bowes JD, Potter C, Gibbons LJ, Hyrich K, Plant D, Morgan AW, et al. Investigation of genetic variants within candidate genes of the TNFRSF1B signalling pathway on the response to anti-TNF agents in a UK cohort of rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009; 19(4):319-23.

433.- Morales-Lara MJ, Cañete JD, Torres-Moreno D, Hernández MV, Pedrero F, Celis R, et al. Effects of polymorphisms in TRAILR1 and TNFR1A on the response to anti-TNF therapies in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2012; 1: 6-11.

434.- Kanda H, Tanaka T, Matsumoto M, Umemoto E, Ebisuno Y, Kinoshita M, et al. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *International immunology*. 2004; 16(9): 1265-74.

435.- Nishimoto K, Ikari K, Kaneko H, Tsukahara S, Kochi Y, Yamamoto K, et al. Association of EMCN with susceptibility to rheumatoid arthritis in a Japanese population. *The Journal of rheumatology*. 2011; 38(2):221-8.

436.- Peltekova VD, Wintle RF, Rubin L a, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature genetics*. 2004; 36(5): 471-5.

437.- Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, et al. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2003; 35(4):341-8.

438.- Newman B, Wintle RF, van Oene M, Yazdanpanah M, Owen J, Johnson B, et al. SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population. *Arthritis and rheumatism*. 2005; 52(2): 425-9.

439.- Barton A, Eyre S, Bowes J, Ho P, John S, Worthington J. Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*. 2005; 52(3):752-8.

440.- Martínez A, Valdivia A, Pascual-salcedo D, Balsa A, Concha ED, Urcelay E, et al. Rheumatoid Arthritis. 2006;33(5):1-6.

441.- Shumilina E, Xuan NT, Matzner N, Bhandaru M, Zemtsova IM, Lang F. Regulation of calcium signaling in dendritic cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J*. 2010; 24(6):1989-96.

442.- Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, et al. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *The Journal of experimental medicine*. 2000; 192(5): 671-80.



- 443.- He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1183: 13-24.
- 444.- S.F. Ziegler, Y.J. Liu, Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 709-714
- 445.- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol.* 2001; 167(1):336-43.
- 446.- Koyama K, Ozawa T, Hatsushika K, Ando T, Takano S, Wako M, et al. A possible role for TSLP in inflammatory arthritis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2007; 357(1): 99–104.
- 447.- Rommel C, Camps M, Ji H. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nature reviews. Immunology [Internet].* 2007; 7(3): 191–201.
- 448.- Fishman MC, Porter JA. News & views feature pharmaceuticals. A new grammar for drug discovery. 2005; 437: 491–3.
- 449.- Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, et al. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2005; 11(9): 936-43.
- 450.- Björkhem I, Eggertsen G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Current opinion in lipidology [Internet].* 2001; 12(2): 97–103.
- 451.- Lathe R. Steroid and sterol 7-hydroxylation: ancient pathways. *Steroids [Internet].* 2002 Nov;67(12):967–77.
- 452.- Dulos J, van der Vleuten M a J, Kavelaars A, Heijnen CJ, Boots AM. CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines. *Arthritis and rheumatism.* 2005; 52(3):770–8.
- 453.- Shahrara S, Castro-Rueda HP, Haines GK, Koch AE. Differential expression of the FAK family kinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial tissues. *Arthritis research & therapy [Internet].* 2007; 9(5):R112.
- 454.- Duong LT, Lakkakorpi PT, Nakamura I, Machwate M, Nagy RM, Rodan G. PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of alpha(v)beta3 integrin, and phosphorylated by src kinase. *The Journal of clinical investigation.* 1998; 102(5):881–92.
- 455.- Wang M, Zhang W, Zhang Y. Expression and activation of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of international medical research.* 2009;37(5):1293–300.
- 456.- Humbert P, Russell S, Richardson H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology [Internet].* 2003; 25(6):542–53.
- 457.- Shah G, Brugada R, Gonzalez O, Czernuszewicz G, Gibbs RA, Bachinski L, et al. the human DLG5 gene : Correction. 2002;1:2002.
- 458.- Chua KH, Lian LH, Kee BP, Thum CM, Lee WS, Hilmi I, et al. Identification of DLG5 and SL-C22A5 gene polymorphisms in Malaysian patients with Crohn's disease. *Journal of digestive diseases.* 2011; 12(6):459–66.
- 459.- Weersma RK, Stokkers PCF, van Bodegraven a a, van Hogezaand R a, Verspaget HW, de Jong DJ, et al. Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort.

Gut. 2009; 58(3):388–95.

460.- Forough R, Weylie B, Collins C, Parker JL, Zhu J, Barhoumi R, et al. Transcription factor Ets-1 regulates fibroblast growth factor-1-mediated angiogenesis in vivo: role of Ets-1 in the regulation of the PI3K/AKT/MMP-1 pathway. *Journal of vascular research*. 2006; 43(4):327–37.

461.- Wei G, Srinivasan R, Cantemir-Stone CZ, Sharma SM, Santhanam R, Weinstein M, et al. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood*. 2009; 114(5):1123–30.

462.- Wernert N, Justen H-P, Rothe M, Behrens P, Dreschers S, Neuhaus T, et al. The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2002; 80(4):258–66.

463.- Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, et al. C-Ets1 Proto-Oncogene Is a Transcription Factor Expressed in Endothelial Cells During Tumor Vascularization and Other Forms of Angiogenesis in Humans. *The American journal of pathology*. 1992; 140(1):119–27.

464.- Iwasaka C, Tanaka K, Abe M SY. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1996;169(3):522–31.

465.- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995; 1(1):27-31.

466.- Jackson JR, Bolognese B, Mangar C a, Hubbard WC, Marshall L a, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta [Internet]*. 1998; 1392(1):145–52.

467.- Termeer C, Johannsen H, Braun T, Renkl A, Ahrens T, Denfeld RW, et al. The role of CD44 during CD40 ligand-induced dendritic cell clustering and maturation cell adhesion and binding to Hyaluronic acid ( HA ). 3 – 12 h with CD154 revealed the rapid induction of. 2001; 70(November): 715–22.

468.- J. Grisar, M. Munk, C. Steiner, L. Amoyo-Minar, M. Tohidast-Akrad, P. Zenz, et al. Expression patterns of CD44 and CD44 splice variants in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2012;30(1):64–72.

469.- Naor D, Nedvetzki S, Walmsley M, Yayon A, Turley EA, Golan I, et al. CD44 involvement in autoimmune inflammations: the lesson to be learned from CD44-targeting by antibody or from knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1110: 233-47.

470.- Suzuki K, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S. Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha. *Blood [Internet]*. 1999; 93(1): 341–9.

471.- Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*. 1997; 9(2): 180–6.

472.- Schieven GL. The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem*. 2009; 9(11): 1038-48.

473.- Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12(7): 795-808.

474.- Bonilla-Hernán MG, Miranda-Carús ME, Martin-Mola E. New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50(9):1542-50.

- 475.- Baumhoer D, Elsner M, Smida J, Zillmer S, Rauser S, Schoene C, et al. CRIP1 expression is correlated with a favorable outcome and less metastases in osteosarcoma patients. *Oncotarget*. 2011; 2(12):970-5.
- 476.- Lo PH, Ko JM, Yu ZY, Law S, Wang LD, Li JL, et al. The LIM domain protein, CRIP2, promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2012; 316(1):39-45.
- 477.- Cheung AK, Ko JM, Lung HL, Chan KW, Stanbridge EJ, Zabarovsky E, et al. Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF-kappaB-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(20):8390-5.
- 478.- Le Quément C, Nicolas Nicolaz C, Zhadobov M, Desmots F, Sauleau R, Aubry M, Michel D, et al. Whole-genome expression analysis in primary human keratinocyte cell cultures exposed to 60 GHz radiation. *Bioelectromagnetics*. 2011. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21812010.
- 479.- Magin TM, Reichelt J, Hatzfeld M. Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Experimental cell research*. 2004; 301(1):91-102.
- 480.- Araya N, Arimura H, Kawahara K-ichi, Yagishita N, Ishida J, Higuchi I, et al. Role of Kenae / CCDC125 in cell motility through the deregulation of RhoGTPase. 2009;24(5): 605-11.
- 481.- Al-Shaibi N GS. A novel phosphoprotein is induced during bone marrow commitment to dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(1):26-30.
- 482.- Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of "single protein RING finger" E3 ubiquitin ligases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology [Internet]*. 2005; 27(11): 1147-57.
- 483.- Joazeiro CA WA. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 2000; 102(5): 549-52.
- 484.- Lalouel JM, Rohrwasser A. Poder y replicación de los estudios de casos y controles, *AJH.Ed. Esp*. 2002; 4: 315-320
- 485.- Association of IL2RA and IL2RB with rheumatoid arthritis: a replication study in a Dutch population. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(11):1789-90.
- 486.- Zhou YJ, Magnuson KS, Cheng TP, Gadina M, Frucht DM, Galon J, et al. Hierarchy of protein tyrosine kinases in interleukin-2 (IL-2) signaling: activation of syk depends on Jak3; however, neither Syk nor Lck is required for IL-2-mediated STAT activation. *Molecular and cellular biology [Internet]*. 2000; 20(12):4371-80.
- 487.- Martinez-a C, Carrera AC. Intermediate Affinity Interleukin-2 Receptor Mediates Survival via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway. 1997;272(15):10220-6.
- 488.- Dowling RJO, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Mar [cited 2012 Aug 4];1804(3): 433-9.
- 489.- Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen J-ho, et al. NIH Public Access. 2009;15(2):148-59.
- 490.- Laragione T, Gulko PS. mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010; 16(9-10): 352-8.
- 491.- Hoffman HM, Brydges SD. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286(13): 10889-96.

- 492.- Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. Annual review of cell and developmental biology [Internet]. 2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/22974247>.
- 493.- Mason DR, Beck PL MD. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and inflammasomes in the pathogenesis of non-microbial inflammation and diseases. *J Innate Immun*. 2012;4(1):16–30.
- 494.- Firestein GS ZN. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum*. 2002;46(2):298–308.
- 495.- Kastbom A, Johansson M, Verma D, Söderkvist P, Rantapää-Dahlqvist S. CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010; 69(4): 723–6.
- 496.- Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology*. 2010; 129(2):178–85.
- 497.- Liu-Bryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. *Immunology and cell biology*. 2010; 88(1):20–3.
- 498.- Nakaoka H, Inoue I, Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J Hum Genet*. 2009; 54 (11): 615-23.
- 499.- Nyman U, Mussener A, Larsson E, Lorentzen J, Klareskog L. Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor Rolipram. *Clin Exp Immunol*. 1997; 108(3): 415-9.
- 500.-Sekut L, Yarnall D, Stimpson SA, Noel LS, Bateman-Fite R, Clark RL, et al. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 1995; 100(1):126-32.
- 501.-Yamamoto S, Sugahara S, Ikeda K, Shimizu Y. Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by a novel phosphodiesterase 7 and 4 dual inhibitor, YM-393059. *Eur J Pharmacol*. 2007; 559(2-3): 219-26.
- 502.- Yan C, Miller CL, Abe J-ichi. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circulation research*. 2007; 100(4): 489–501.
- 503.- Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108(5): 671-80.
- 504.-Gantner F, Gotz C, Gekeler V, Schudt C, Wendel A, Hatzelmann A. Phosphodiesterase profile of human B lymphocytes from normal and atopic donors and the effects of PDE inhibition on B cell proliferation. *Br J Pharmacol*. 1998; 123(6): 1031-8.
- 505.- van der Deure WM, Appelhof BC, Peeters RP, Wiersinga WM, Wekking EM, Huyser J, et al. Polymorphisms in the brain-specific thyroid hormone transporter OATP1C1 are associated with fatigue and depression in hypothyroid patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69(5): 804-11.
- 506.- Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 2008; 38(7-8): 778-801.
- 507.-Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012; 52: 135-51.

508.- Ramsey LB, Bruun GH, Yang W, Trevino LR, Vattathil S, Scheet P, et al. Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res.* 2012; 22(1): 1-8.

509.- Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol.* 2009; 27(35): 5972-8.

510.- Vee ML, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(3): 685-93.

511.- O'Neill L a J. Primer: Toll-like receptor signaling pathways--what do rheumatologists need to know? *Nature clinical practice. Rheumatology.* 2008; 4(6): 319-27.

512.- Roman-Blas J a, Jimenez S a. Targeting NF-kappaB: a promising molecular therapy in inflammatory arthritis. *International reviews of immunology.* 2008; 27(5): 351-74.