

**DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y
FARMACIA**



***FARMACOGENÉTICA DE LA ARTRITIS
REUMATOIDE, PAPEL DE LOS
NEUTRÓFILOS EN LA PATOLOGÍA.***

**TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR:**

SARA GARCÍA MONTAÑÉS

DIRIGIDA POR:

**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ
DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**

VALENCIA, 2016



Dr. *Julio Cortijo Gimeno*, Catedrático de la Universidad de Valencia.

Dr. *Javier Milara Payá*, Farmacéutico adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral presentada por D. *Sara García Montañés*, con el Título ***Farmacogenética de la artritis reumatoide, papel de los neutrófilos en la patología***, ha sido realizada bajo su dirección, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 9 de mayo de 2016:

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Dr. Javier Milara Payá

Índice de abreviaturas:

Ac: anticuerpo.

ACCP: anticuerpo anti péptido citrulinado.

ACR: American College of Rheumatology.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

AICAR: ribonucleótido aminoimidazol carboxamida adenosina.

AINE: antiinflamatorio no esteroideo.

AP: antipalúdicos.

AR: artritis reumatoide.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CAM: moléculas de adhesión celular.

CHGUV: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

CMH II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos.

COX: ciclo-oxigenasa.

DAS: disease activity score.

DAS28: 28-joint disease activity score.

DHODH: dihidrooroato deshidrogenasa.

EULAR: liga europea contra el reumatismo.

EVA: escala visual analógica.

FAME: fármaco modificador de la enfermedad.

FAMES: fármacos modificadores de la enfermedad.

Fc γ R: receptor de la fracción constante de inmunoglobulina G.

FR: factor reumatoide.

GCs: glucocorticoides.

G-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas.

GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas.

Gp 130: proteína gp 130.

GUIPCAR: guía de práctica clínica en el manejo de la artritis reumatoide.

HAQ: health assessment questionnaire.

HLA: antígeno leucocitario humano.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleuquina.

IL-1Ra: antagonista del receptor de la interleuquina 1.

INF γ : interferón gama.

JAK: janus kinasa.

LEF: leflunomida.

MCP-1: proteína quimiotáctica atrayente de monocitos.

MMP 9: metaloproteínasa de matriz extracelular nueve.

MTX PGs: metotrexato poliglutamado.

MTX: metotrexato.

NAD: número de articulaciones dolorosas.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NAT: número de articulaciones tumefactas.

NAT-2: n acetil transferasa dos.

NETS: neutrophil extracellular traps.

NF- κ B: factor nuclear kapa beta.

NK: natural killer.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPG: osteoprotegerina.

OR: odds ratio.

PADI: enzima peptidoarginil desaminasa.

PAF: factor activador de plaquetas.

PCR: proteína C reactiva.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RANK: receptor activador de factor nuclear kapa beta.

RANKL: ligando del receptor activador de factor nuclear kapa beta.

RT: retrotranscripción.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

SER: Sociedad Española de Reumatología.

SNP: polimorfismo de un único nucleótido.

SOCS-3: señal supresora de citoquinas.

STAT: transductor de señal y activador de la transcripción.

TGF- β : factor transformador del crecimiento beta.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TNF-R: receptor del factor de necrosis tumoral alfa.

TRAF-6: receptor del factor de necrosis tumoral asociado a factor 6.

TYMS: timidilato sintetasa.

VEGF: factor de crecimiento endotelial.

VSG: velocidad de sedimentación globular.

Índice general:

Índice de abreviaturas:.....	5
Índice general.....	11
1. Introducción	15
1.1 Definición de Artritis Reumatoide.....	17
1.2 Epidemiología de la artritis reumatoide.....	18
1.3 Factores de riesgo.	20
1.5 Manifestaciones clínicas de la AR.	35
1.5.1 Manifestaciones articulares de la AR.	35
1.5.2 Manifestaciones extra-articulares de la AR.....	38
1.6 Índices para evaluar la actividad de la enfermedad.....	45
1.7 Fisiopatología de la Artritis Reumatoide.....	50
1.7.1 Papel de las inmunoglobulinas.....	50
1.7.2 Formación de inmunocomplejos.....	65
1.7.3 Papel de los Neutrófilos en la AR.	68
1.8. Factores genéticos asociados a la enfermedad:	78
1.9. Tratamiento de la AR:.....	82
1.9.1 Terapia Convencional:	83
1.9.2. Fármacos Modificadores de la enfermedad (FAMES):.....	86
1.10 Farmacogenética de la AR:	103
1.10.2 Farmacogenética de los FAMES biológicos:	107
2. Hipótesis y Objetivos:.....	113
2.1 Hipótesis.....	115
2.2 Objetivos	116

3. Material y Métodos:.....	119
3.1 Material.	121
3.1.1 Pacientes y sujetos sanos.	121
3.1.2 Muestras biológicas.....	122
3.1.3 Reactivos y Kits utilizados.	122
3.2 Diseño.....	123
3.2.1 Diseño de los subestudios.	123
3.2.2 Variables demográficas y clínicas.....	128
3.2.3 Variables de respuesta al tratamiento.	131
3.2.3 Variables de toxicidad al tratamiento.	132
3.2.4 Obtención de sangre periférica para el aislamiento de ADN y de neutrófilos.	133
3.2.5 Extracción de ADN genómico y genotipado.....	134
3.2.6 Extracción neutrófilos y expresión de ARN en neutrófilos.	147
3.3 Análisis estadístico.	158
4. Resultados:	161
4.1 Reclutamiento y características clínicas de los pacientes con artritis reumatoide y de los controles.....	163
4.2 Estudio de genotipado casos-contrroles.	169
4.2.1 Análisis de distribuciones de SNPs en casos y controles: comparación con el estudio HapMap.	169
4.2.2 Análisis de distribuciones de SNPs: equilibrio de Hardy- Weinberg.....	172
4.2.3 Estudio de asociación genotípica: estudio casos-contrroles de polimorfismos genéticos.	174
4.3 Estudio casos-contrroles de expresión en neutrófilos de sangre periférica.	181

4.4 Estudio de correlaciones entre genotipo y variables clínicas en pacientes con artritis reumatoide.....	187
4.5 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y variables clínicas en pacientes con artritis reumatoide.....	191
4.6 Estudio de correlaciones entre genotipo y respuesta a MTX.	191
4.7 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y respuesta a MTX.....	197
4.8 Estudio de correlaciones entre genotipo y toxicidad a MTX.	198
4.9 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y toxicidad a MTX.....	204
4.10 Estudio de correlaciones entre genotipo y respuesta/toxicidad a anti-TNF- α	205
4.11 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y respuesta/ toxicidad a anti-TNF- α	207
5. Discusión:	209
6. Conclusiones:	233
7. Referencias bibliográficas:	237
ANEXO I: Hoja de información al paciente.....	259
ANEXO II: Consentimiento informado.....	263
ANEXO III: Aprobación del proyecto de investigación.	269

1. Introducción:

1.1 Definición de Artritis Reumatoide.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, autoinmune y degenerativa que afecta principalmente a las membranas sinoviales (1), causando una poliartritis que evoluciona hacia la deformación y destrucción articular. Las pequeñas articulaciones de pies y manos son las que con mayor frecuencia se ven afectadas aunque el proceso puede aparecer en cualquier articulación sinovial y pueden verse afectados hombros y rodillas (2). Hay un amplio espectro de manifestaciones y el cuadro puede ser leve y autolimitado o grave (3), siendo las principales manifestaciones clínicas el dolor articular, rigidez e hinchazón (1, 4). La falta de tratamiento o el tratamiento inadecuado resulta en una erosión de la superficie articular que provoca deformidad y pérdida de la capacidad funcional, lo que supone una discapacidad irreversible (Figura 1). Existen además otras manifestaciones extraarticulares de la enfermedad y se han observado mayores tasas de mortalidad que en la población general (ratio de mortalidad estandarizada 1,28-2,98) siendo en más de un 50% de los casos muertes prematuras asociadas a enfermedades cardiovasculares (3). Se ha observado que la AR puede reducir la esperanza de vida de 3 a 10 años (5).

La principal característica diferencial de esta enfermedad es la distribución simétrica de las lesiones articulares apareciendo sobre todo a nivel de manos y pies, aunque casi todas las articulaciones diartrodiales pueden verse afectadas (6).

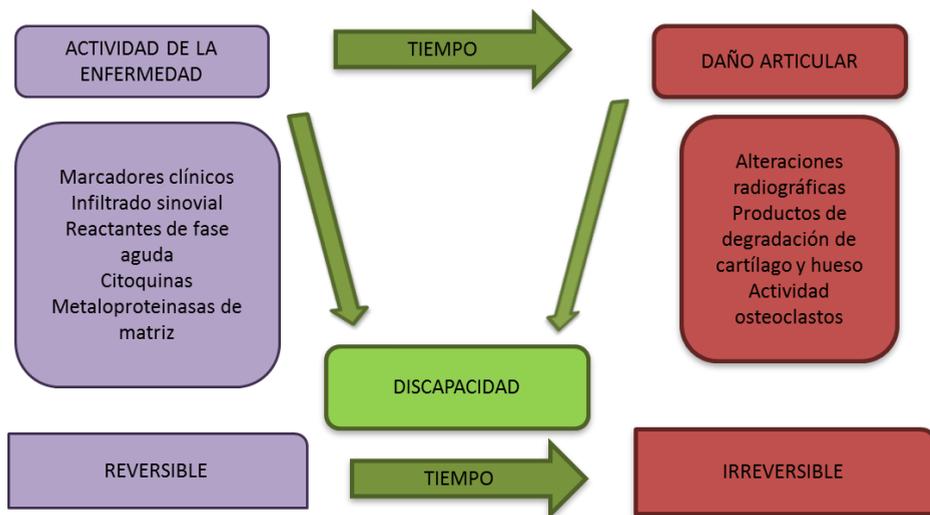


Figura 1. Evolución hacia discapacidad de la AR. Adaptado de Arthritis Res Ther. 2008;10(3):208 (7)

1.2 Epidemiología de la artritis reumatoide.

Los estudios sobre la incidencia y prevalencia de la AR sugieren variaciones entre poblaciones diferentes, incluso dentro del mismo país, siendo su distribución universal (Figura 2). Afecta aproximadamente al 0,8% de la población (8) y de acuerdo con una revisión sistemática de 2005 e informes publicados más

recientemente, la tasa de incidencia anual de la AR varía entre 20 y 50 casos por 100.000 habitantes en América del norte y los países del norte de Europa, aunque parece ser menor en los países del sur (9) y es considerada la más común de las enfermedades auto-inmunes (10). En España un estudio desarrollado en 2008 estimó una incidencia de AR de 8.3 casos/100.000 (95% CI: 7.5, 9.2), muy por debajo de la media de los países del norte de Europa aunque similar a la de otros países de la cuenca mediterránea (9).



Figura 2. Prevalencia mundial de Artritis Reumatoide en 2010 (11).

La estimación de la incidencia de la AR presenta dos problemas principales: uno es el retraso entre el inicio de los síntomas y la consulta médica y el segundo es la aplicación de los criterios de la

American College of Rheumatology (ACR) 1987 para definir los casos, que dependen del tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y su aplicación y de cómo se aplican los mismos (12).

Se trata de una enfermedad que afecta principalmente a mujeres (ratio 2:1) y aparece más frecuentemente entre los 40-60 años. (8)

En España en un estudio desarrollado en 2002 se obtuvo una prevalencia estimada del 0,5% siendo la relación entre mujeres/hombres y zonas urbanas/rurales de 4:1 en ambos casos (13).

La diferente distribución geográfica de la enfermedad puede explicarse por variaciones en las costumbres, el clima, la exposición a distintos factores ambientales y a factores genéticos.

1.3 Factores de riesgo.

Actualmente existe una lista creciente de factores ambientales relacionados con la susceptibilidad a la AR entre los que destaca por ser el más estudiado y mejor establecido el tabaco (14, 15), aunque también se han identificado aspectos relacionados con la dieta, la exposición a contaminantes ambientales o a ciertos microorganismos.

Se ha relacionado la incidencia de la enfermedad con el consumo de tabaco, demostrándose además que su papel en el desarrollo de la misma está asociado al polimorfismo genético del gen HLA-DRB, por

lo que algunos autores proponen como prevención de la enfermedad, el especial control del hábito tabáquico en población con antecedentes familiares de AR (16). La presencia de anticuerpos anti-péptido citrulinado (ACCP) es uno de los marcadores más específicos en el diagnóstico de la AR, más incluso que el factor reumatoide (FR), y se ha observado una mayor proporción de pacientes fumadores entre aquellos con ACCP positivo, por lo que la influencia de los factores ambientales podría estar condicionada por el componente genético (15, 17). Aunque la influencia del hábito tabáquico en el aumento de la incidencia de la enfermedad está bien establecida, no se ha podido relacionar con la evolución, obteniéndose resultados contradictorios en diferentes estudios como la menor progresión radiográfica en fumadores muy activos frente a fumadores moderados (18).

El mecanismo por el cual el tabaco induce la aparición de la enfermedad en estos pacientes no está del todo dilucidado aunque se sabe que se relaciona estrechamente con su capacidad de provocar citrulinización de proteínas directamente en pulmón y se ha observado un aumento de proteínas citrulinadas en el lavado bronqueoalveolar de individuos fumadores sanos (19). La citrulina se produce por una modificación estructural de la arginina catalizada por la enzima peptidoarginil deaminasa (PADI) (Figura 3). El mecanismo por el que

se produce esta reacción probablemente se relacione con el estrés oxidativo que el propio humo del tabaco produce a nivel pulmonar. Parece que los radicales libres derivados del tabaco son capaces de activar la región promotora del gen que codifica la PADI con lo que su concentración en el citosol de las células pulmonares se ve incrementada (19, 20). Por otro lado el propio estrés oxidativo produce la apoptosis de las células pulmonares liberándose el contenido celular y las enzimas PADI activadas con lo que se alteran proteínas extracelulares y se genera una respuesta inmunitaria con la aparición de ACCPs.

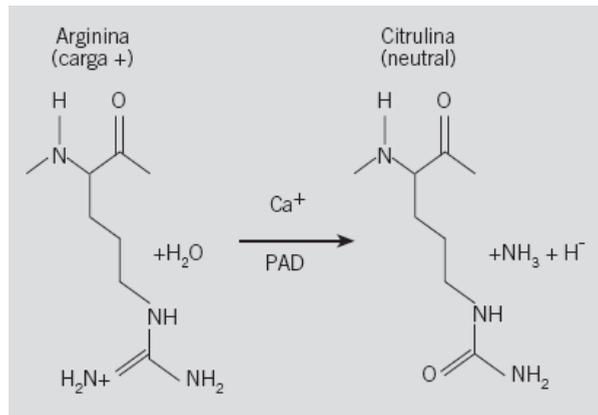


Figura 3. Esquema de la conversión de la arginina a citrulina por acción de la peptidoarginil deaminasa (PADI).

El alcohol es otro factor de riesgo habitual para el desarrollo de múltiples enfermedades sin embargo en el caso de la AR parece actuar como un elemento protector, reduciendo el riesgo de desarrollar AR AACP positiva. Además parece que el efecto es dosis dependiente observándose mayor protección en aquellos pacientes que consumen elevadas cantidades (15, 17).

La vitamina D está implicada en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa jugando un importante papel como supresora de la actividad pro-inflamatoria. Se ha demostrado que niveles elevados actúan como factor protector para ciertas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (17). En pacientes con AR se observan niveles bajos de vitamina D que se correlacionan con pérdida de material óseo, gravedad de la enfermedad y evolución hacia discapacidad (21). Sin embargo, aunque se correlaciona con el pronóstico de la enfermedad y juega un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio (incluyendo la respuesta celular a interleuquinas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la diferenciación de linfocitos y la expresión de metaloproteinasas (MMPs)), su papel en el inicio de la enfermedad no ha podido establecerse (17).

Como ya se ha comentado, el perfil hormonal parece tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad por la distinta incidencia entre sexos. Los anticonceptivos orales se han relacionado con el incremento del riesgo de sufrir ciertas enfermedades, principalmente del sistema cardiovascular. En cambio en el caso de la AR parecen presentar un papel protector (17).

Entre los factores relacionados con la dieta también se ha identificado la ingesta abusiva de cafeína como factor de riesgo, aunque sólo en pacientes con FR positivo (15).

Por otro lado parece que ciertas bacterias anaerobias podrían jugar un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad (22). Esta hipótesis se ve reforzada por el aislamiento de ADN y elevados títulos de anticuerpos frente a estas bacterias tanto en suero como en líquido sinovial de pacientes con AR (23). Se ha identificado como posible desencadenante de la enfermedad un patógeno periodontal causante de gingivitis (*Porphyromonas gingivalis*) que además es capaz de degradar la matriz extracelular y acceder a circulación sistémica (23). Posee la capacidad de citrulinar fibrinógeno y alfa-enolasa con lo que se postula que actúa potenciando la actividad de los ACCPs de la misma forma que parece ejercer su efecto el tabaco (24).

En cuanto al nivel socioeconómico los individuos con mayor nivel educativo y aquellos que no realizan trabajos físicos presentan una menor incidencia de la enfermedad (17). La obesidad es otra de las características estudiadas; hasta el momento los resultados parecen indicar que la obesidad incrementa el riesgo de sufrir AR sólo en aquellos individuos que no presentan factor reumatoide (seronegativos) (15).

Por otro lado el componente genético tiene un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad siendo responsable del 50-60% del riesgo de desarrollo de la AR (25). El factor de riesgo genético más importante está localizado en la región que codifica la proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (CMH II), que supone alrededor de un 30% de la susceptibilidad genética global de padecer AR (2), y que además se relaciona con la gravedad de las manifestaciones. Diversas técnicas de biología molecular han permitido identificar alelos específicos asociados a la AR; en concreto en 1986 Gregsen identificó una secuencia de aminoácidos del CMH tipo II conservada en los pacientes con AR y codificada por el gen HLA-DRB1 (Figura 4). El 80% de los pacientes de AR son portadores del epítipo HLA-DRB1*04 y los pacientes que expresan dos alelos

HLA-DRB1*04 presentan más riesgo de enfermedad nodular y mayor necesidad de cirugía asociada a la destrucción articular (26).

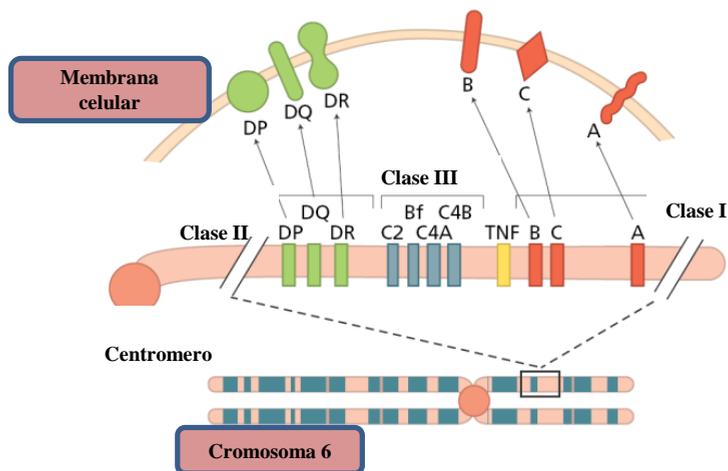


Figura 4. Localización genética HLA-DR en el cromosoma 6 (27).

De este descubrimiento surgió la teoría del epítipo compartido como factor de riesgo genético para la enfermedad, aunque posteriormente se observó que sólo se cumplía en aquellos pacientes con ACCPs positivos, lo que parece suponer un perfil de susceptibilidad genética diferente, poniendo de manifiesto la existencia de una subdivisión de la enfermedad entre pacientes con ACCPs positivos y negativos. Las células presentadoras de antígenos tras procesar partículas extrañas o del propio organismo, presentan pequeños péptidos unidos a moléculas del CMH II (Figura 5), y en el

caso de los pacientes con AR seropositivos para AACCP la unión a péptidos citrulinados es mucho más fuerte gracias a la secuencia de aminoácidos determinada por variaciones específicas del gen HLA-DRB1.

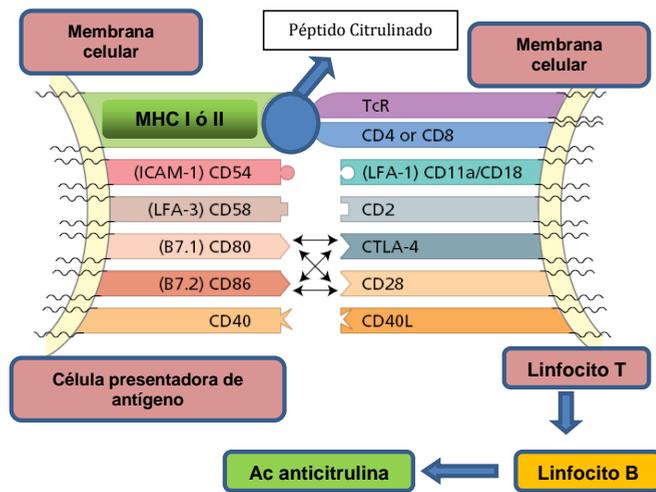


Figura 5. Esquema de interacción célula presentadora - linfocito T y producción de ACCP.

Tradicionalmente, la teoría del epítipo compartido establecía que diferentes polimorfismos del gen HLA-DRB1 daban lugar a secuencias de aminoácido específicas “QRRAA, RRRAA y QKRAA” localizadas en las posiciones 70-74 de la subunidad beta 1 (Figura 6) de la molécula HLA-DRB1. Dichas secuencias de aminoácido conferían una mayor afinidad por los residuos citrulinados. Sin

embargo, un reciente estudio publicado en Nature Genetics (28) ha cambiado esta teoría dando todo el peso a un polimorfismo del HLA-DRB1 que da lugar a un cambio de aminoácido valina por leucina en la posición aminoacídica 11, la cual confiere un Odds Ratio (OR) de susceptibilidad a padecer AR de un 3,7 con una significación estadística de $P < 10^{-581}$.

Esto conlleva una respuesta inmunitaria mucho más potente, lo que determina la mayor actividad de la enfermedad y el peor pronóstico de este subgrupo de pacientes.

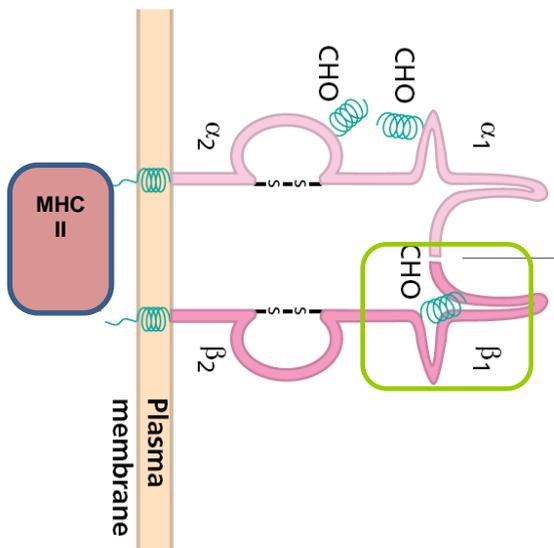


Figura 6. Composición MHC II. Localización secuencia de aminoácidos conservada de alta afinidad por los residuos citrulinados en el MHC tipo II DRB1 (marcada en cuadro verde).

Alrededor de 30 años después del descubrimiento del epítipo compartido, se descubrió otro gen situado fuera de la región del HLA-DRB1, el gen que codifica la enzima peptidarginildeaminasa (PADI) responsable de la producción de citrulina a partir de arginina. A partir de entonces se han identificado múltiples polimorfismos asociados al desarrollo de la enfermedad (Figura 7).

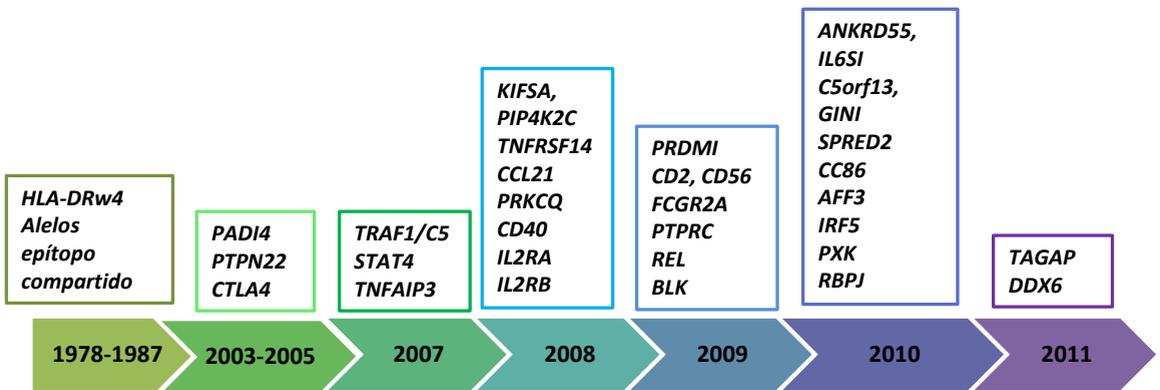


Figura 7. Principales genes implicados en el desarrollo de la enfermedad por orden cronológico de descubrimiento (2).

Sin embargo en los pacientes con ACCP negativos el único factor genético asociado a la AR identificado por el momento es el asociado al HLA-DR3. Esto no determina que la carga genética sea más importante en el primer subtipo de AR ya que estudios recientes

muestran que el porcentaje de pacientes que heredan la patología es similar en las dos variedades, pacientes AACP + y - (29).

Por lo tanto entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de la AR encontramos tanto factores ambientales como factores genéticos, pudiendo determinar estos últimos la influencia de los factores ambientales (Figura 8).

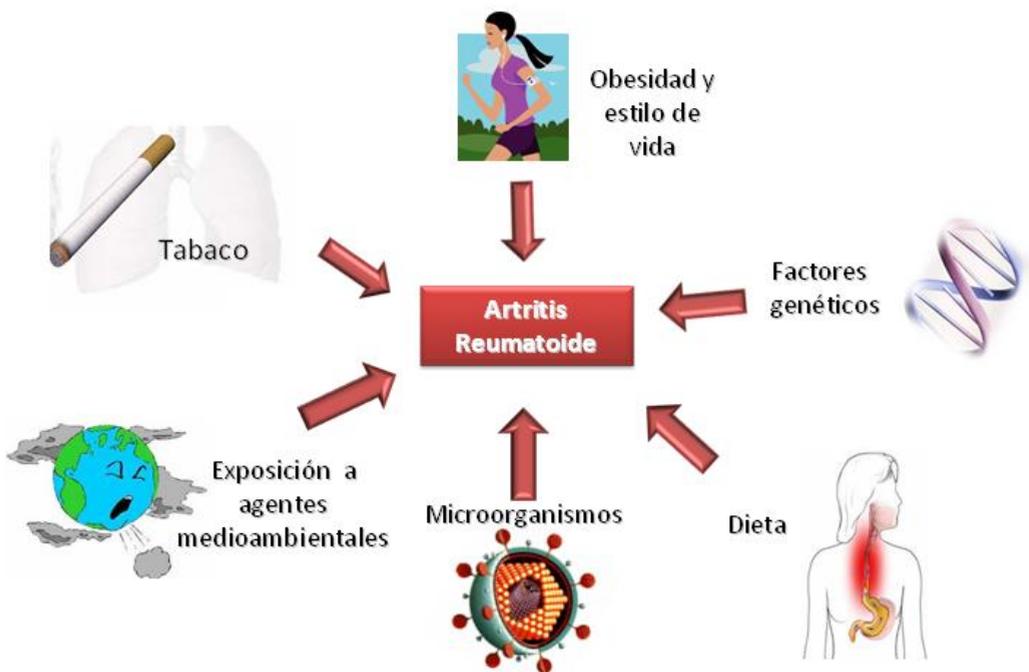


Figura 8. Factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la AR.

1.4 Diagnóstico.

El objetivo del tratamiento es conseguir la remisión de la enfermedad, entendida como la ausencia de evidencias de inflamación sinovial (3). En la práctica clínica se recomienda, por tanto, la instauración temprana de una estrategia terapéutica agresiva con fármacos modificadores de la enfermedad, por lo que es necesario realizar un diagnóstico temprano (30).

El conjunto de criterios más aplicado para realizar el diagnóstico de la enfermedad a nivel mundial son los publicados por el Colegio Americano de Reumatología en 1987, que se elaboraron para realizar la clasificación de pacientes con diagnóstico de enfermedad reumática en AR o no AR. El diagnóstico se realiza cuando el paciente cumple cuatro de los siete criterios incluidos en la Tabla 1 (31).

Tabla 1. Criterios revisados de Clasificación de la AR (ACR, 1987).(31). Los cuatro primeros criterios deben mantenerse al menos durante seis semanas antes de realizar el diagnóstico.

Criterios revisados de clasificación de AR (American College of Rheumatology 1987)
1. Rigidez matutina de al menos una hora de duración.
2. Artritis de tres o más áreas* simultáneamente, objetivada por un médico.
3. Artritis de las articulaciones de la mano que afecta al menos una de las siguientes áreas: carpo, metacarpofalángicas e interfalángicas proximales.
4. Artritis simétrica.
5. Presencia de nódulos reumatoides objetivados por un médico.
6. Presencia del factor reumatoide (FR).
7. Hallazgos radiológicos típicos de la AR en la radiografía posteroanterior de manos, que incluyan erosiones u osteopenia yuxtaarticular en las áreas afectadas.

* Se consideran 14 posibles áreas articulares: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, carpos, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas derechas o izquierdas.

La principal limitación de este sistema de diagnóstico es su escasa sensibilidad para detectar precozmente la enfermedad, lo que provoca que en la mayoría de pacientes no pueda realizarse un tratamiento temprano que limite la evolución de la enfermedad y la aparición de lesiones óseas (3, 32). En la artritis ya establecida, la sensibilidad y especificidad del sistema es alta (79% y 90% respectivamente), mientras que en la artritis temprana estos valores se

reducen al 77% en ambos casos por lo que algunos autores recomiendan emplear este sistema en la clasificación de la enfermedad y no en el diagnóstico.

Se han elaborado nuevos criterios aunque de momento no tienen validez externa y su uso no está demasiado extendido (30, 33). Actualmente el objetivo es realizar una detección precoz de la enfermedad ya que una minoría de pacientes que posteriormente desarrollan AR pueden ser diagnosticados en la primera consulta mediante el sistema ACR 1987 debido a que los signos y síntomas incluidos no suelen cumplirse durante el primer año de la enfermedad (30). Varios estudios muestran que la enfermedad aparece tras una fase preclínica de varios años de duración y si pudiera ser detectada en esta fase supondría una mejora notable en el pronóstico de estos pacientes (34).

La búsqueda de parámetros diagnósticos en estadios más tempranos de la enfermedad ha centrado la investigación de los últimos años. Se ha descubierto que la presencia de auto-anticuerpos (concretamente Inmunoglobulinas (Igs) M anti fracción constante Ig G (FR) y ACCP) y de reactantes de fase aguda precede al inicio de las manifestaciones clínicas (34). Estos autoanticuerpos aparecen aproximadamente 5 años antes del inicio de las manifestaciones

clínicas y se ha visto que un 30% de los pacientes con artralgia y auto anticuerpos desarrollan AR en un periodo de 1 año.

Hasta la fecha el marcador serológico de diagnóstico más ampliamente empleado ha sido el factor reumatoide (FR) que presenta sin embargo poca especificidad, ya que está presente en otras patologías reumáticas, en algunos individuos sanos (ancianos) (35) y en patologías como la hepatitis viral crónica o la endocarditis bacteriana. Presenta una especificidad del 79% (31-95%) y una sensibilidad del 60% (25-95%) (36).

Los anticuerpos anti péptidos citrulinados (ACCP) reconocen proteínas citrulinadas que se obtienen por una modificación estructural de las moléculas de arginina catalizada por la enzima peptidoarginildeaminasa (PADI). Esta reacción ocurre de forma natural en individuos sanos en la piel y el sistema nervioso (19) y también como consecuencia de procesos inflamatorios. Sin embargo el suero de individuos sanos está libre de autoanticuerpos lo que hace suponer que su producción esté asociada a una respuesta humoral inadecuada (6). La presencia de autoanticuerpos determina el diagnóstico de la enfermedad en un elevado porcentaje de pacientes. Este test tiene una sensibilidad del 68% (39-94%) y una especificidad del 95% (81-100%), lo que le otorga mayor sensibilidad y

especificidad que el FR aunque su uso no está tan extendido (6). Estos anticuerpos pueden ayudar al clínico a diferenciar la artritis de otras patologías en las que el FR puede ser positivo como el lupus eritematosos sistémico, el síndrome de sjögren, la hepatitis C o la artritis psoriasisica entre otras.

1.5 Manifestaciones clínicas de la AR.

La evolución natural de la enfermedad en la mayoría de pacientes consiste en una inflamación constante y de baja intensidad acompañada de brotes que progresivamente producen la destrucción articular, deformidad, discapacidad e incluso la muerte prematura. Los síntomas pueden aparecer de forma repentina y aguda o pueden ser de aparición lenta e insidiosa. Los síntomas característicos de la enfermedad aparecen inicialmente a nivel articular, aunque también pueden aparecer al inicio otras alteraciones como anorexia, debilidad o fatiga.

1.5.1 Manifestaciones articulares de la AR.

La manifestación principal de la AR es el dolor articular acompañado de rigidez e inflamación y su aparición suele producirse simultáneamente en varias articulaciones. Las articulaciones que con

mayor frecuencia se ven afectadas son aquellas con mayor tasa de cartílago y líquido sinovial, destacando por la elevada frecuencia en la que están implicadas, las articulaciones de pequeño tamaño como las interfalángicas proximales, metacarpianas de las manos y metatarsianas de los pies, aunque la artritis también se encuentra presente en muñecas, codos, hombros, rodillas, caderas o tobillos (Figura 9).

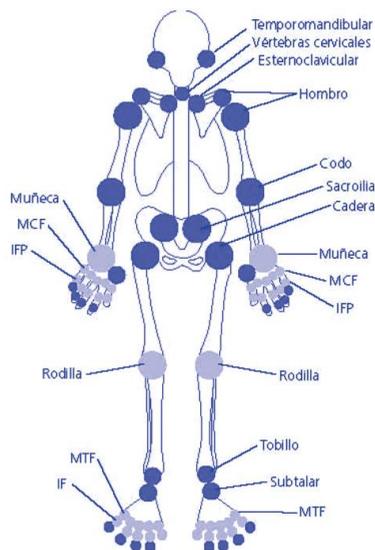


Figura 9. Articulaciones afectadas según frecuencia (las más oscuras presentan menor frecuencia de afectación). Imagen extraída de la página web de la Sociedad Española de Reumatología.

Uno de los primeros síntomas clínicos que se manifiesta en los pacientes con AR es la rigidez matutina de las articulaciones inflamadas. Posteriormente, las articulaciones aparecen dolorosas, tumefactas, calientes y eritematosas (Figura 10). El dolor puede variar desde una ligera molestia con la movilización, hasta un dolor intenso, que persiste incluso en reposo y empeora con la presión y el movimiento articular.



Figura 10. Tobillo afectado por artritis reumatoide en estadios iniciales.

Finalmente, tal como se ha comentado la falta de tratamiento o el tratamiento inadecuado terminan por producir una lesión ósea que

implica la incapacidad para flexionar la articulación y la deformidad de la misma (Figura 11).



Figura 11. Artritis reumatoide avanzada en manos.

1.5.2 Manifestaciones extra-articulares de la AR.

A pesar de que las principales manifestaciones se producen a nivel osteoarticular, la AR es una enfermedad sistémica y está asociada a alteraciones cutáneas y específicas de ciertos órganos. Se relaciona con mayor incidencia de anemia (propia de procesos inflamatorios crónicos), osteoporosis, depresión relacionada con la desregulación del eje hipotálamo-hipofisario y con un incremento de los accidentes cardiovasculares (26). Aunque hay múltiples estudios de cohortes sobre estas alteraciones extra-articulares no existe una clasificación uniforme. Su incidencia es variable (17,8-47,5%) y no

todos los individuos que padecen la enfermedad presentan las mismas lesiones ni con la misma intensidad. Se ha observado una mayor incidencia en los países del norte de Europa con respecto a los del sur lo que hace suponer que, de nuevo, el componente genético y ambiental juega un importante papel en la aparición de estas complicaciones.

Estas alteraciones pueden aparecer en cualquier momento durante la evolución de la enfermedad, incluso en etapas tempranas y se relacionan con mayor gravedad y peor pronóstico (37). Destacan por su incidencia los nódulos reumatoideos, vasculitis, alteraciones oculares, alteraciones pulmonares, alteraciones cardiovasculares y las alteraciones renales:

1.5.2.1 Nódulos reumatoideos.

Se trata de nódulos subcutáneos de 1 a 5 centímetros de diámetro de consistencia firme y que no muestran signos inflamatorios (Figura 12). Las localizaciones más frecuentes son las zonas de flexión y roce como los codos, los dedos de las manos, las rodillas y los pabellones auriculares aunque también se han descrito nódulos reumatoideos extra-cutáneos en pacientes que presentaban este tipo de lesiones en esclera, músculo esquelético, pulmón o corazón.

Habitualmente las lesiones son asintomáticas y no requieren tratamiento.

Es la manifestación extra-articular más común, y afecta sobre todo a pacientes con factor reumatoide (FR) positivo: alrededor del 40% de los pacientes con FR + presentan nódulos reumatoideos mientras que entre los pacientes seronegativos la incidencia es tan sólo del 6% (38).

Se desconoce la etiopatogenia pero se ha propuesto que pueden ser el resultado de mecanismos vasculíticos, traumatismos repetidos y del depósito de inmunocomplejos.

Niveles elevados de FR se relacionan con una mayor incidencia de esta manifestación y con peor evolución de la enfermedad.

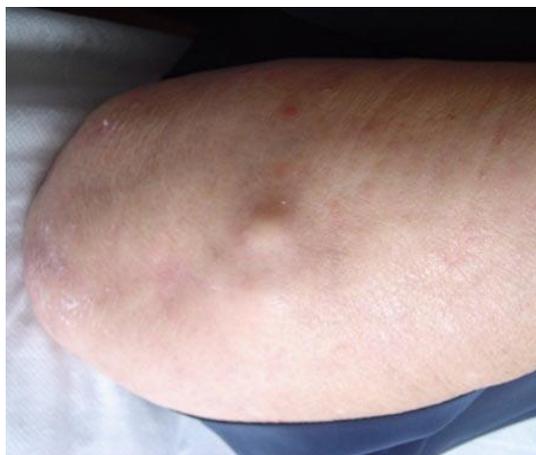


Figura 12. Nódulo reumatoideo en paciente con AR.

1.5.2.2 Vasculitis.

La vasculitis reumatoidea es una complicación rara y de difícil diagnóstico sobre todo si afecta a órganos internos en lugar de aparecer en forma de lesiones cutáneas; esto provoca que su prevalencia según estudios clínicos oscile de un 1 a un 5% revelándose en estudios basados en autopsias una prevalencia superior, del orden del 15 al 31% (39). Es la manifestación extra-articular más grave. Se trata de una lesión tisular o isquemia causada por una vasculitis caracterizada por la presencia de células mononucleares e infiltrado de neutrófilos en la pared de vasos de mediano y pequeño tamaño. Frecuentemente existe una necrosis de la propia pared de los vasos y una obstrucción de éstos, con la consiguiente producción de infartos en tejidos distales al área afectada.

Puede afectar a cualquier órgano, aunque lo más frecuente es que las lesiones aparezcan a nivel de la piel (Figura 13) y de nervios periféricos.

El tratamiento depende de la gravedad y del órgano implicado. En casos leves en los que se ve afectada la piel o nervios periféricos el tratamiento habitual es prednisona junto con metotrexato o azatioprina

mientras que casos más graves pueden requerir elevadas dosis de esteroides y ciclofosfamida o fármacos biológicos.



Figura 13. Úlceras reumatoideas secundarias a vasculitis en paciente con mal control de artritis reumatoide (39).

1.5.2.3 Alteraciones oculares.

Entre las manifestaciones reumáticas oculares se incluyen la queratitis, escleritis y epiescleritis, retinopatía y el síndrome de Sjögren secundario. Aproximadamente un 27% de los pacientes presentan alteraciones oculares siendo las más frecuentes el síndrome de sjögren y la escleritis (37). El Síndrome de Sjögren secundario se caracteriza por la presencia de sequedad de las membranas mucosas, con síntomas que van desde ojos secos, sensación de ardor y cuerpos

extraños, secreción mucosa, hasta el desarrollo de blefaritis crónica (40).

1.5.2.4 Alteraciones pulmonares.

La patología pulmonar es frecuente entre los pacientes con AR y constituye un factor de mal pronóstico, siendo una importante causa de morbi-mortalidad (41). Las manifestaciones pulmonares más habituales son la enfermedad pleural, la fibrosis intersticial, la enfermedad nodular pulmonar, la bronquiolitis y la arteritis con hipertensión pulmonar.

La fibrosis intersticial pulmonar es la manifestación pulmonar más frecuente aunque los estudios sobre su incidencia muestran resultados variables según el método de diagnóstico aplicado (42); afecta aproximadamente a un tercio de los pacientes con AR.

1.5.2.5 Alteraciones cardiovasculares.

Desde el aumento de la esperanza de vida de este grupo de pacientes debido al avance de los tratamientos, se ha observado que existe una gran diferencia en la incidencia de eventos cardiovasculares respecto a grupos control. Particularmente se observa un incremento importante en los acontecimientos de este tipo entre los pacientes con FR positivo (43).

La afección cardíaca en la AR incluye pericarditis, valvulitis, miocarditis y un aumento de la prevalencia de enfermedad coronaria aterosclerótica. El pericardio está afectado en aproximadamente un 40% de los pacientes, y la pericarditis es la manifestación cardíaca más frecuente en la AR (44). También se produce un incremento del riesgo de sufrir insuficiencia cardíaca congestiva (43).

Se observa un incremento en el riesgo de mortalidad cardiovascular asociado a la AR debido principalmente a una arterosclerosis acelerada en arterias coronarias y del sistema cardiovascular así como a otras complicaciones incluyendo el fallo cardíaco. Un meta-análisis reciente muestra un incremento de un 50% del riesgo de muerte por eventos cardiovasculares entre los pacientes con AR respecto a controles con un índice de riesgo basado en parámetros clásicos similar. Además el riesgo cardiovascular es independiente de la duración de la enfermedad habiéndose identificado casos de muerte por evento cardiovascular en pacientes con FR positivo y reciente poli artritis (43).

Se desconoce el mecanismo por el que se produce este incremento de alteraciones cardiovasculares, aunque se atribuye en parte al proceso inflamatorio que podría acelerar la formación de placas de ateroma y a la actividad de un subgrupo de linfocitos T

(CD4+CD28-) que se encuentra en elevada concentración en pacientes con artritis reumatoide y en las placas de ateroma. De hecho se observa una relación directa entre elevados mediadores de la inflamación y la formación acelerada de placas de ateroma (45). Por otro lado tanto el FR como los ACCP constituyen un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cardiopatías isquémicas aunque su papel aún no está claro.

1.5.2.6 Alteraciones renales.

Las manifestaciones renales son raras y con frecuencia aparecen de forma secundaria al tratamiento con ciertos fármacos, sobre todo anti-inflamatorios no esteroideos. Las alteraciones más frecuentes son la glomerulonefritis, la amiloidosis que provoca proteinuria severa y el síndrome nefrítico (37). Hasta un 10% de pacientes con AR presentan proteinuria secundaria a la presencia de amiloidosis renal. El depósito de amiloide es más frecuente en pacientes con un desarrollo largo de la enfermedad y con mala respuesta al tratamiento.

1.6 Índices para evaluar la actividad de la enfermedad.

La medida de la actividad de la enfermedad en la AR permite evaluar y comparar los tratamientos utilizados en los pacientes que

desarrollan la enfermedad. Los índices de evaluación de la actividad son una herramienta fundamental para el manejo de la enfermedad y los resultados del tratamiento dependen de la capacidad del clínico de determinar el nivel de actividad y la falta de respuesta. De hecho estos índices validados permiten tomar decisiones clínicas como el inicio de tratamiento, la adición de un nuevo medicamento, el cambio de tratamiento o incluso la retirada (4).

Además de un instrumento para el clínico constituyen el método de comparación de medicamentos nuevos en los ensayos clínicos. En la actualidad está extendido el uso de índices compuestos como los propuestos por la ACR, que incluyen un conjunto básico de medidas de actividad de la enfermedad (ACR20, ACR50 y ACR70) o el Disease Activity Score (DAS).

La Sociedad Española de Reumatología (SER) recomienda, tras el consenso aprobado en 1992 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la European League Against Rheumatism (EULAR) y la ACR, que el conjunto mínimo de parámetros que se deben medir en todos los pacientes para evaluar la actividad de la enfermedad y así poder determinar sobre bases objetivas si se ha conseguido el objetivo terapéutico, sean:

Número de articulaciones dolorosas (NAD) y tumefactas (NAT). Se recomienda hacer un mínimo recuento de 28 articulaciones.

Dolor evaluado por el paciente. Se recomienda utilizar una escala visual analógica (EVA) horizontal de 10 cm, dividida mediante marcas verticales en 10 segmentos iguales de 1 cm. Las mediciones se acompañarán con descriptores numéricos del 0 (ningún dolor) al 10 (máximo dolor).

Evaluación global de la enfermedad efectuada de forma independiente por el médico y el enfermo. Se recomienda utilizar el mismo tipo de EVA anterior, con descriptores numéricos del 0 al 10, aunque en este caso los extremos indicarán muy bien (0) y muy mal (10).

Reactantes de fase aguda. Se recomienda incluir la velocidad de sedimentación globular (VSG) y los valores de proteína C reactiva (PCR).

Evaluación de la capacidad funcional. Se recomienda evaluar la función física autopercibida mediante cuestionarios validados. El HAQ (Health Assessment Questionnaire) de 20 ítems (que se puntúa en una escala de 0 a 3 graduada en pasos de 0,125) parece el más adecuado para su utilización en clínica. Actualmente, se considera que

un cambio de dos pasos en la escala del HAQ, es decir, una variación de 0,25 puntos, equivaldría a un cambio real o clínicamente significativo.

Evaluación del daño estructural. Se recomienda realizar una radiografía de manos y pies así como de cualquier otra articulación especialmente afectada, con una frecuencia anual, durante los primeros 3 o 4 años de evolución de la enfermedad, o cuando se inicie tratamiento biológico.

Actualmente el índice más comúnmente utilizado para medir la actividad en la AR es el DAS28 (28-Joint disease activity score). El DAS28 es un parámetro multifactorial obtenido mediante una fórmula compleja que tiene en cuenta la evaluación del dolor e inflamación en 28 articulaciones por parte del clínico, la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la evaluación del estado general percibido por el paciente y medido a través de una escala visual analógica (EVA)(4).

Para su cálculo se utilizan las siguientes fórmulas según se utilicen 3 o 4 variables:

$$\text{DAS28 (4)} = 0,56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0,70 \ln(\text{VSG}) + 0,014 (\text{EVA})$$

$$\text{DAS28 (3)} = [0,56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0,70 \ln (\text{VSG})] \\ 1,08 + 0,16$$

Existe una modificación del DAS28, en la que en lugar de utilizar como reactante de fase aguda la VSG, se utiliza la PCR, conocido como DAS-PCR. Se calcula con las siguientes fórmulas según se utilicen 3 o 4 variables:

$$\text{DAS28 (4)} = 0,56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0,36 \ln (\text{PCR}+1) \\ + 0,014 (\text{EVA}) + 0,96$$

$$\text{DAS28 (3)} = [0,56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0,36 \ln \\ (\text{PCR}+1)] (1,10+1,15)$$

El DAS28 se puntúa de 0 a 11, donde 0 significa ausencia de actividad y 11 máxima actividad. La enfermedad se clasifica en función del valor de DAS28 en varios grados de actividad inflamatoria y el tratamiento busca obtener la remisión completa (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación de la actividad inflamatoria según el DAS28 extraída de la Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Artritis Reumatoide en España, 2007.

Remisión	$<2,4$
Actividad baja	$2,4 < \text{DAS28} < 3$
Actividad moderada	$3,1 < \text{DAS28} < 5,1$
Actividad alta	$\geq 5,1$

1.7 Fisiopatología de la Artritis Reumatoide.

1.7.1 Papel de las inmunoglobulinas.

En el proceso patológico de la artritis reumatoide se produce una inflamación crónica del tejido sinovial de las articulaciones. El proceso inflamatorio está mediado fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citoquinas, pero también factores de crecimiento, cuyo efecto final es la remodelación del tejido sinovial y destrucción del cartílago y el hueso subyacente, así como diversas manifestaciones extraarticulares (46). De forma fisiológica en el proceso inflamatorio están implicadas moléculas que activan la inflamación, moléculas que la mantienen y otras que inhiben y detienen el proceso. En los estados de inflamación crónica

como es el caso de la AR existe un desequilibrio entre estos factores lo que deriva en daño celular (47).

En condiciones normales la arquitectura articular permite el movimiento y la flexibilidad gracias a su estructura segmentada en combinación con el cartílago que representa una superficie con un bajo índice de fricción. La membrana sinovial tiene la función de dar soporte estructural, lubrica las superficies y proporciona nutrientes al cartílago. Está constituida por una fina capa porosa que contiene dos tipos principales de células (Tipo A: similar a macrófagos, y Tipo B: sinoviocitos tipo fibroblasto) y que por su morfología porosa puede contribuir a que se depositen complejos inmunes, células bacterianas y otros materiales en la articulación. (48)

En la AR la estructura de la membrana sinovial cambia por completo, pasa de ser una organización con un bajo contenido en células y prácticamente avascular a convertirse en un tejido de granulación invasivo y altamente vascularizado denominado *pannus*. Este tejido es el producto de la proliferación de sinoviocitos y de la infiltración de células de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, entre las que se incluyen monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos que actúan liberando mediadores pro inflamatorios (49). La invasión del *pannus* del espacio articular lleva finalmente a la

destrucción de cartílago y hueso viéndose afectado tanto el esqueleto axial como apendicular. La destrucción de cartílago y hueso se produce como consecuencia de la interacción entre sinoviocitos tipo fibroblasto y células de la respuesta inmune innata: incluyendo macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos y células natural killer (NK) y de la respuesta adaptativa: linfocitos T y B (50). Entre estas células destacan por su actividad los linfocitos CD4+ que son activados tras la presentación de antígenos asociados a moléculas del CMH II. Por otro lado los macrófagos además de ser la principal fuente de producción de citoquinas expresan moléculas del CMH II con lo que actúan presentando antígenos lo que perpetúa la respuesta inmunitaria. Aunque se desconoce el responsable del inicio de la respuesta, por el momento se han identificado algunos antígenos endógenos como los péptidos citrulinados, la glicoproteína 39 del colágeno humano y las proteínas de unión de cadena pesada, y algunos exógenos como determinadas proteínas virales (47). Las células CD4+ activadas estimulan la producción por parte de macrófagos, monocitos, neutrófilos y sinoviocitos de citoquinas como la IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) a través de ligandos de membrana y a través de la liberación de mediadores solubles como

el interferon γ (IFN γ) y la IL-17 (Figura 14). Por otro lado los linfocitos T CD4 activados interactúan con linfocitos B a través de moléculas de superficie (CD154 y CD28) induciendo la liberación de IgGs incluyendo el FR y los ACCP que pasaran a formar parte de inmunocomplejos amplificándose la respuesta (51). Además de todo esto, esta línea de linfocitos T, estimulada por la IL-1 y el TNF- α , produce el ligando del receptor activador NF- κ B (RANKL) que favorece la diferenciación de los precursores hacia la línea osteoclástica, lo que provoca que la remodelación ósea esté desregulada. En la AR predomina la actividad osteoclástica provocando la resorción ósea, lo que incrementa el riesgo de fractura de hueso (51, 52) (Figura 14). Los sinoviocitos también son capaces de expresar moléculas de superficie que influyen en el proceso de remodelado óseo.

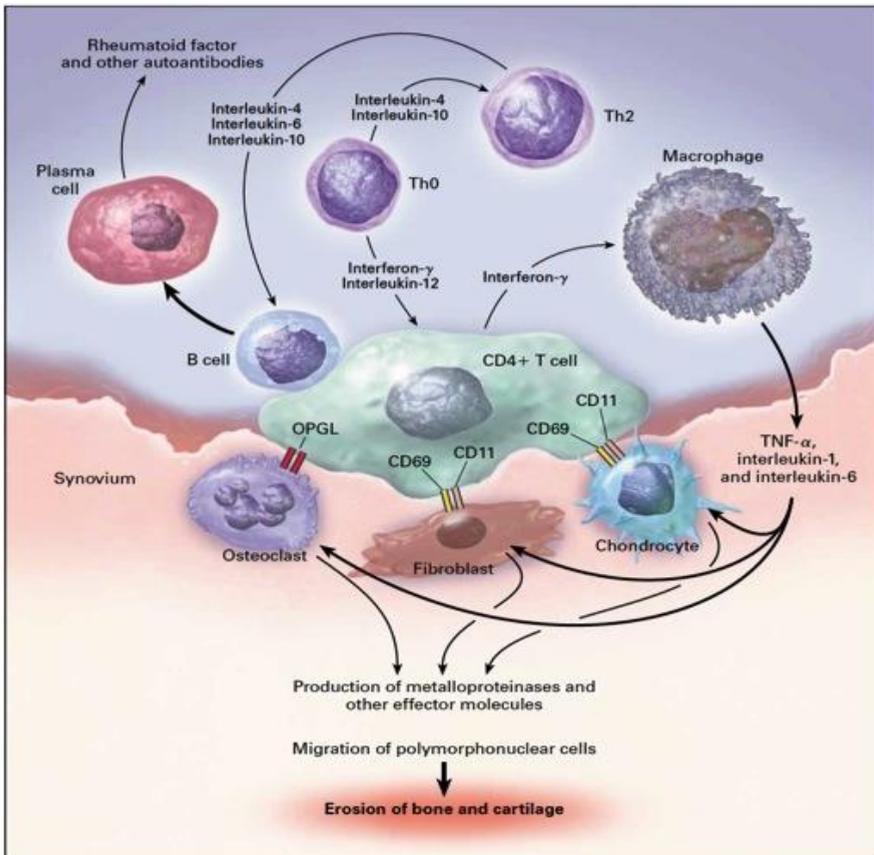


Figura 14. Los linfocitos CD4 + activados estimulan a monocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales que producen interleuquina-1, interleuquina-6 y TNF- α y secretan metaloproteinasas de matriz mediante el contacto con receptores CD69 y CD11 así como a través de la liberación de mediadores solubles tales como interferon e interleucina 17. Los linfocitos CD4 + también estimulan a las células B, a través del contacto de la superficie celular y mediante su unión a través del CD154 (ligando CD40) y CD28 e inducen la producción de inmunoglobulinas, incluyendo el factor reumatoide. Además las células CD4 + activadas expresan como ligando osteoprotegerina que estimula la osteoclastogénesis.

El TNF- α y la IL-1 β liberadas en el espacio sinovial estimulan la producción por parte de sinoviocitos y condrocitos de MMPs, las cuales producen la destrucción del tejido cartilaginoso favoreciendo la migración de otras células inflamatorias. Además estas citoquinas junto con la IL-8 promueven la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) en las células del endotelio, lo que atrae a más células inflamatorias potenciando el proceso (53). Por otro lado, el TNF- α y la IL-1 β inducen la expresión en fibroblastos de factor de crecimiento endotelial (VEGF) lo que favorece la angiogénesis y provoca el incremento de vascularización del tejido sinovial (54). Además existe una retroalimentación del proceso ya que la IL-1 induce la expresión del TNF- α y viceversa.

El TNF- α es producido principalmente por macrófagos, pero también lo liberan linfocitos T, B, fibroblastos y otros leucocitos. Es un potente estimulador autocrino y paracrino; actúa mediante su unión a dos receptores: el receptor de TNF- α tipo I (p55) y el de tipo II (p75), que se encuentran en las membranas de células inmunitarias, inflamatorias y endoteliales, siendo el receptor tipo I el principal mediador de la señalización del TNF- α . Estos receptores también se encuentran solubilizados en el ambiente con lo que reducen la unión a los receptores de membrana y modulan parcialmente la actividad del

TNF- α . Su unión a los receptores de membrana promueve la liberación de IL-1, IL-6, IL-8, MMPs y factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF) (Figura 15). Además provoca la expresión de moléculas de adhesión en fibroblastos, las que interactúan con sus correspondientes ligandos de leucocitos promoviendo la migración de los mismos al espacio sinovial.

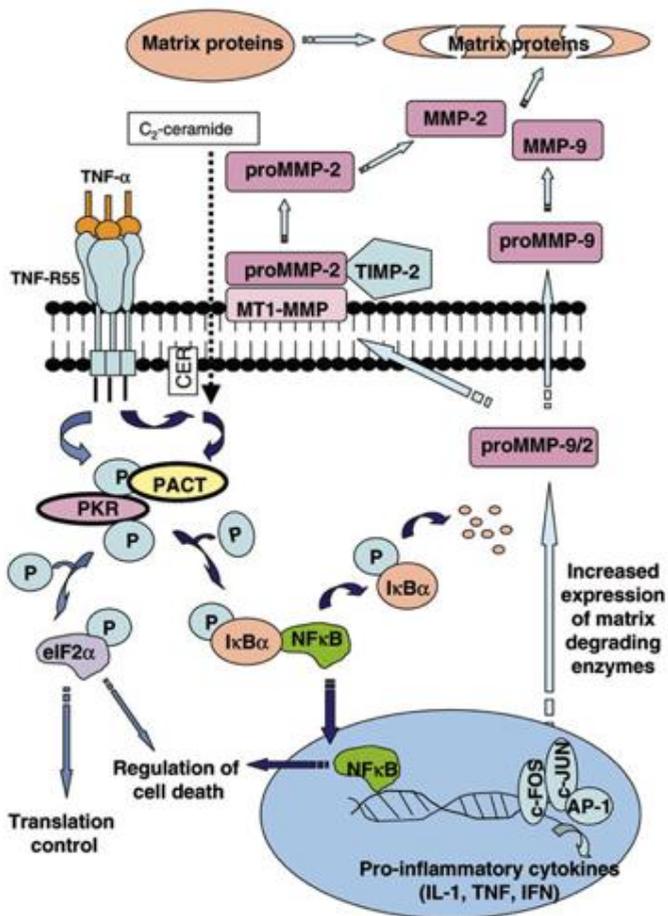


Figura 15. Unión de TNF alfa a su receptor y activación de factores de transcripción que conllevan la expresión de interleuquinas proinflamatorias entre otros mediadores importantes en el proceso inflamatorio de la AR.

La IL-1 tiene un papel importante en la formación del pannus y en el deterioro de la articulación. El proceso por el que actúa es más complejo que en el caso del TNF-α ya que existen 2 receptores

diferentes que no ejercen el mismo efecto: el tipo I provoca la activación celular y la transducción de señales que inician la transcripción de citoquinas y factores de crecimiento y el tipo II que no produce ningún tipo de respuesta por no presentar dominio intracelular. El receptor tipo I se encuentra principalmente en las células T, mientras que el de tipo II se expresa principalmente en neutrófilos, monocitos y células B. Ambos receptores se encuentran libres como formas solubles, compitiendo con la unión de los receptores de membrana. Además, de forma fisiológica se genera un antagonista del receptor de la IL-1 (IL1-Ra) que impide los efectos de la misma al bloquear su lugar de unión. Del equilibrio existente entre estas moléculas-receptores depende su mayor o menor efecto pro-inflamatorio (47, 55).

Junto con el TNF- α , la IL-1 provoca una regulación al alza de la expresión de genes pro-inflamatorios, incluyendo la óxido nítrico sintasa inducible y la ciclooxigenasa 2, lo que provoca que aparezcan en el ambiente grandes cantidades óxido nítrico y prostanglandina E2. El exceso de óxido nítrico ejerce efectos oxidativos lesivos directamente sobre los tejidos y además produce alteraciones en la permeabilidad vascular y regula la actividad de los linfocitos T por

distintos mecanismos, con lo que se ha propuesto su bloqueo como una posibilidad terapéutica en tratamientos futuros (56).

Por otro lado la IL-1 podría cumplir un papel más importante en los procesos destructivos de la AR, debido a su capacidad de inhibir el proceso de reparación tisular. La IL-1 es capaz de inhibir tanto la síntesis de nuevas proteínas de la matriz en el cartílago (como el colágeno tipo II), como la proliferación de los condrocitos, los cuales son necesarios para la reparación del cartílago (57).

Otra citoquina con un papel fundamental en el desarrollo de la AR es la IL-6, para la que existe una correlación directa entre su concentración en el líquido sinovial y el nivel de marcadores de inflamación y la severidad de la destrucción del hueso a nivel radiográfico (58, 59). Es producida mayoritariamente por linfocitos T, macrófagos y monocitos y es una citoquina clave en la producción de proteínas de fase aguda, aunque su papel no se limita a esta fase ya que participa en el desarrollo de respuestas humorales y celulares específicas incluyendo la activación de linfocitos T y la etapa final de producción de inmunoglobulinas por parte de linfocitos B. Induce el paso de linfocitos T a linfocitos T citotóxicos mediante la estimulación de la expresión del receptor de la IL-2 y de la producción de la misma (58). La IL-6 tiene un papel importante en la transición

aguda-crónica de la inflamación (59). Ejerce su efecto a través de su unión a un receptor transmembrana asociado a proteína G (gp130) que conecta con una Janus Kinasa (JAK) que induce la fosforilación de activadores de la transcripción/traductores de señal (STAT) que activan la transducción de citoquinas, factores de crecimiento etc. (Figura 16).

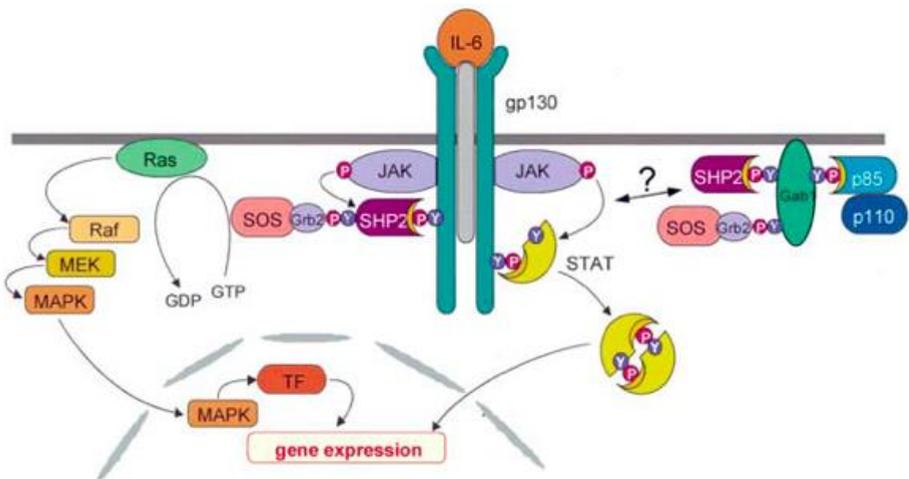


Figura 16. Activación de JAK y fosforilación de mediadores que inducen la expresión de proteínas de fase aguda entre otras tras la interacción IL-6 con IL-6R-gp130 (60).

El receptor para la IL-6 se expresa únicamente en las membranas de leucocitos y hepatocitos, pero puede ser liberado en forma soluble desde la membrana de neutrófilos. Este receptor soluble (sIL-6R) se combina con la IL-6 para unirse a la proteína transmembrana gp130, presente en diferentes grupos celulares, entre los que se incluyen células endoteliales y sinoviocitos, activando la cascada de señales que finalmente se traducirá en la expresión de genes del proceso inflamatorio (59).

El complejo IL-6/IL6R favorece el paso de neutrófilos a macrófagos como célula predominante del proceso inflamatorio. Favorece la producción por parte de células endoteliales de IL-8, proteína quimiotáctica atrayente de monocitos (MCP-1), moléculas de adhesión, factor activador de plaquetas (PAF) e IL-6. Estas proteínas quimiotácticas producidas en el espacio sinovial atraen neutrófilos que liberan sIL-6R y retroalimentan el proceso. Los neutrófilos activados durante varias horas por moléculas proinflamatorias también liberan MCP-1 lo que incrementa la atracción de monocitos al foco inflamatorio, que se ve favorecido por el efecto que tiene a nivel de la hematopoyesis ya que favorece la diferenciación de precursores hacia la línea monocítica (58). Además la estimulación continua de la IL-6

en los neutrófilos induce la apoptosis de estas células lo que se traduce en una reducción de los mismos en el foco inflamatorio (Figura 17).

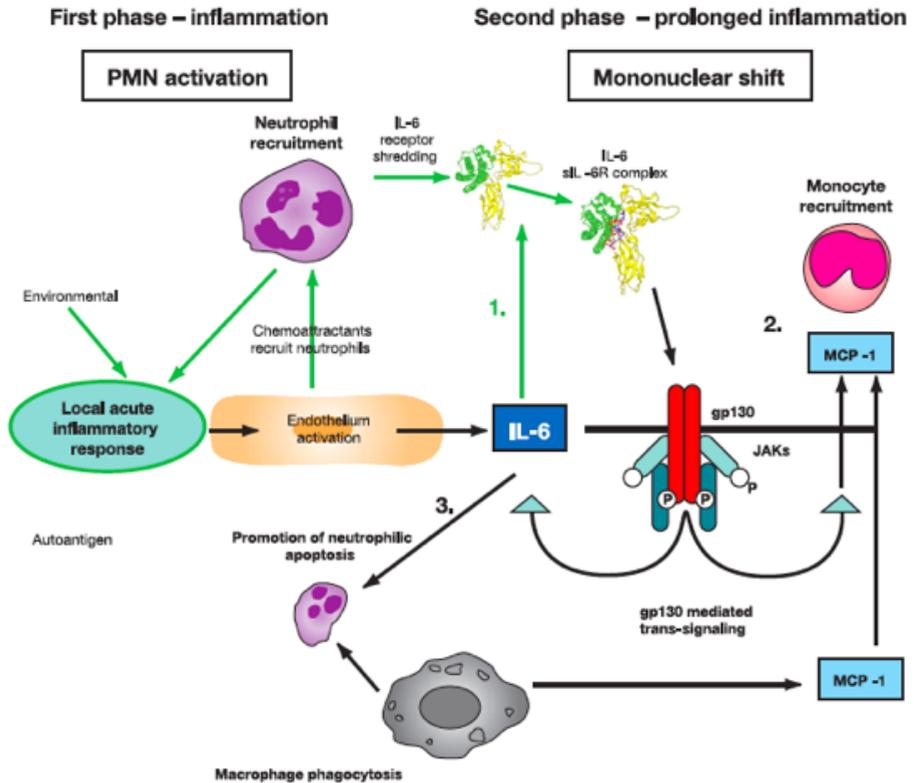


Figura 17. Paso de inflamación aguda a crónica mediada por IL-6. 1: Unión de IL-6 a sIL-R y activación de transducción de genes; 2: Reclutamiento de monocitos; 3: Inducción de apoptosis de neutrófilos por estimulación prolongada por parte de IL-6 y fagocitosis (59).

Además de todo esto la IL-6 tiene un profundo efecto sobre el hueso ya que favorece la diferenciación de los precursores hacia la

línea osteoclástica y atrae células del mesénquima vascular lo que provoca la neo-angiogénesis contribuyendo también a la hipervascularización del tejido (58).

En resumen la IL-6 inicialmente promueve la respuesta aguda, pero cuando su estímulo se mantiene el proceso agudo se convierte en un proceso crónico en el que además se incrementan los niveles de IL-6 retroalimentando el proceso (59).

Como ya se ha comentado, en la inflamación hay un equilibrio entre los mediadores que la potencian y los que la inhiben. En el caso de la AR también aparecen en las articulaciones afectados mediadores que bloquean o reducen el efecto inflamatorio, sin embargo parecen encontrarse en cantidad insuficiente con lo que el resultado es la incapacidad para detener el proceso.

Las 2 citoquinas antiinflamatorias más estudiadas son la IL-10 y la IL-4. Las cuatro principales células productoras de IL-10 son los linfocitos Th2 colaboradores y subgrupos de células T reguladoras denominadas Tr1, Th1 y Th17. Otras células productoras de IL-10 son los linfocitos T CD8+, monocitos y macrófagos (tras el estímulo adecuado), células dendríticas, eosinófilos o mastocitos y células inmunitarias como los queratinocitos, células epiteliales y células tumorales (47).

La IL-10 actúa mediante su unión a un complejo formado por 2 receptores IL-10R1 e IL-10R2. El responsable del efecto es el IL-10R2 aunque para que se produzca es necesaria la unión a ambos receptores. La unión provoca la activación de la Janus quinasa 1 (JAK1) y la tirosin-quinasa 2 que fosforilan la parte intracelular de los receptores lo que resulta en el reclutamiento de STAT3 hacia el receptor IL-10R1 lo que provoca la homodimerización y la migración hacia el núcleo donde se une a la región promotora de varios genes. Además activa la señal supresora de citoquinas (SOCS3) que tiene un efecto regulador negativo sobre varias citoquinas (61).

En cuanto a los efectos biológicos, la IL-10 actúa como potente inhibidor de la presentación de antígenos, reduce la expresión de MHC II así como de receptores co-estimuladores CD80 y CD86 e inhibe la diferenciación y maduración de células dendríticas (presentadoras de antígenos). Además tiene un potente efecto inhibidor en la producción de las principales citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) y de MMPs. Por otro lado la IL-10 es capaz de inducir la liberación por parte de macrófagos del IL-1Ra, lo que bloquea parcialmente el efecto de esta citoquina proinflamatoria y es capaz de revertir el proceso de degradación de cartílago en pacientes con AR (47, 61).

La IL-10 sin embargo puede ejercer un efecto proinflamatorio estimulando la proliferación de células natural killer (NK), y la activación y diferenciación de linfocitos B. Esta estimulación podría estar regulada por la cantidad de IL-10 presente en el foco inflamatorio (61).

La IL-4 es producida por linfocitos T CD4+ tipo 2 colaboradores y participa en la diferenciación y crecimiento de linfocitos B. In Vitro inhibe la actividad de células T colaboradoras tipo 1 lo que reduce la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α e inhibe el daño en el cartílago. Además también induce la producción de IL1-Ra lo que tiene un efecto anti-inflamatorio (47). Actualmente existen datos contradictorios sobre su posible papel como inhibidor de la inflamación crónica en la AR, por lo que están garantizados estudios futuros (62).

1.7.2 Formación de inmunocomplejos.

Los inmunocomplejos (ICs) son estructuras formadas por aglutinación de anticuerpos (Acs) unidos a antígenos específicos. La formación de estas estructuras no es exclusiva de enfermedades autoinmunes ya que se produce también en individuos sanos donde normalmente son eliminados por procesos de fagocitosis. Sin embargo si el proceso de limpieza de estos complejos no se produce

adecuadamente puede inducirse una respuesta inflamatoria sostenida. En el suero y el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide los inmunocomplejos podrían contribuir al daño articular a través de diferentes mecanismos, como la activación del complemento (63). Se ha observado que los ICs aislados a partir de suero de pacientes con AR inducen la producción de óxido nítrico, alteran el crecimiento de condrocitos y modifican el proceso de apoptosis de células inmunitarias lo que contribuye directamente a la destrucción articular (63).

El principal Ac implicado en la formación de estas estructuras en la AR es el FR, una Ig M que une específicamente la fracción constante de la Ig G. Además, recientemente, se ha demostrado que en los inmunocomplejos extraídos de plasma y líquido sinovial de pacientes ACCP positivos aparecen restos de proteínas citrulinadas, destacando la vimentina y el fibrinógeno citrulinado, unidos a los propios anticuerpos (64, 65).

Las Igs que forman parte de estos inmunocomplejos activan mediante su unión a receptores específicos (como son los receptores de fracción constante de inmunoglobulinas tipo γ (Fc γ R)), células del sistema inmunitario, sinoviocitos y células endoteliales con gran relevancia en el proceso patológico de la AR. Existen varios subtipos

de Fc γ R: Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb que se expresan en distintos grupos celulares teniendo un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad. Ciertos polimorfismos en los genes que codifican estas proteínas podrían predisponer a padecer la enfermedad y condicionar la respuesta al tratamiento como veremos más adelante. Son responsables de la activación del complemento, la estimulación de la fagocitosis y de la liberación de factores quimiotácticos, citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8), GM-CSF, MMPs y de especies reactivas de oxígeno (63).

Es interesante destacar que la unión de la fracción constante de las IgGs que forman parte de los inmunocomplejos induce una respuesta variable en los neutrófilos según su unión se produzca al receptor transmembrana Fc γ RIIa o Fc γ RIIIb. Las señales asociadas a la activación del Fc γ RIIa inician quimiotaxis y fagocitosis cuando se encuentran con sueros opsonizados con bacterias. Sin embargo la unión al Fc γ RIIIb parece tener un papel fundamental en la secreción de especies reactivas de oxígeno por parte de neutrófilos en respuesta a inmunocomplejos, mientras que no parece inducir el proceso de fagocitosis o degranulación ante el contacto con suero opsonizado. Ya que la activación de neutrófilos por inmunocomplejos es una causa de lesión sobre la articulación en la AR y dado que el bloqueo del

Fc γ RIIIb no inhibe la actividad antibacteriana de estas células se ha propuesto como posible diana terapéutica puesto que evitaría la liberación masiva de ROS sin comprometer la respuesta bactericida de los neutrófilos (66).

La interacción de los ICs con los Fc γ R expresados en macrófagos induce la degranulación, la transcripción de IL-1 y TNF- α , la liberación de mediadores de la inflamación y el inicio del proceso de fagocitosis. Se ha observado que los macrófagos de individuos afectados por AR expresan mayor cantidad de Fc γ RII y Fc γ RIII respecto a individuos sanos y, por tanto, liberan mayores cantidades de TNF- α ante estímulos con ICs. (64)

1.7.3 Papel de los Neutrófilos en la AR.

En condiciones normales los neutrófilos constituyen cerca del 60% de los leucocitos circulantes y son las primeras células reclutadas a las zonas de infección o inflamación. Una vez llegan a estas zonas pasan a compartir varias funciones con macrófagos, particularmente respecto a la producción y expresión de moléculas inmunoreguladoras. Muchas de estas funciones adquiridas se producen por un cambio en la expresión genética en los neutrófilos activados (67) secundaria a la influencia de citoquinas y a la menor presión de oxígeno así como a la reducción del pH ambiental. De

todas las células de la respuesta inmunitaria los neutrófilos poseen la mayor capacidad citotóxica y son las más abundantes en las articulaciones inflamadas de pacientes con AR, constituyendo aproximadamente un 90% de las células halladas en el líquido sinovial (68). Además de generar daño directo actualmente se sabe que tienen un papel fundamental en la organización del proceso inflamatorio a través de su influencia sobre otras células de la respuesta inmunitaria (Figura 18). Esta regulación la llevan a cabo a través de cuatro mecanismos: la secreción de un amplio rango de citoquinas y quimioquinas, el aumento de la expresión de receptores de superficie como los MHC II, interacciones célula-célula y liberación de proteasas que pueden activar o desactivar citoquinas.

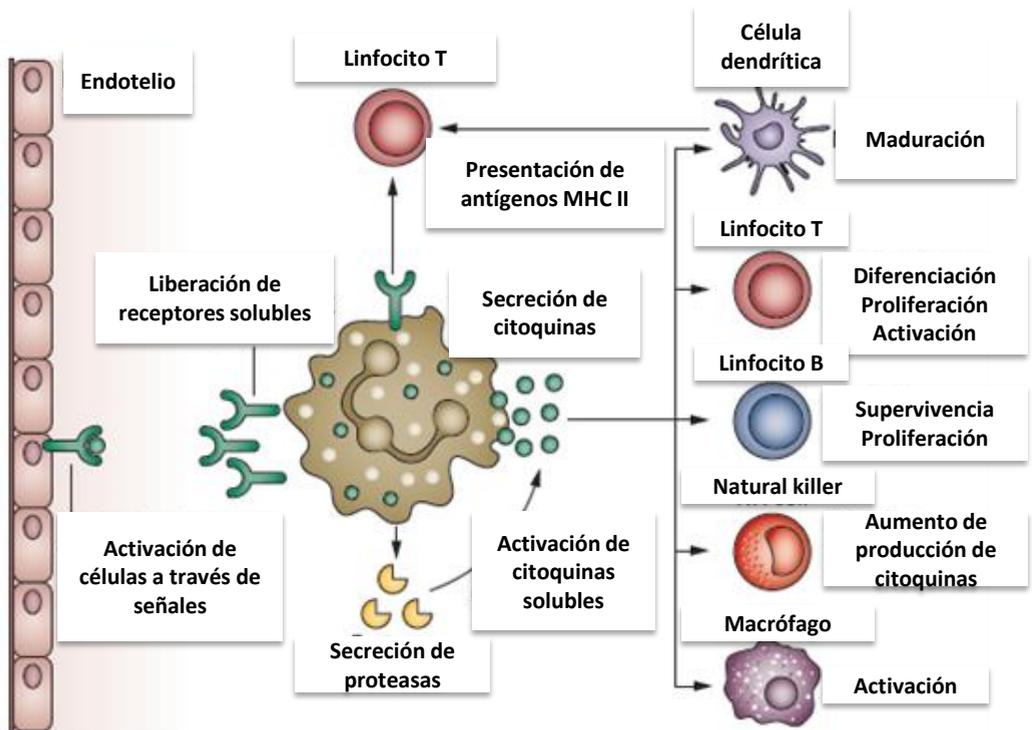


Figura 18. Modulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa por parte de neutrófilos activados. Comunicación de neutrófilos activados con otras células de la respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas y de la presentación de antígenos asociados a MHC II. Las citoquinas pueden ser secretadas en su forma activa o como pro-péptidos que serán activados tras la escisión producida por proteasas liberadas por neutrófilos. Estas proteasas además pueden inducir la liberación de receptores de membrana (como el de la IL-6) que una vez liberados actúan como mediadores solubles de la inflamación, iniciando la señalización en células que no expresan constitutivamente dicho receptor (67).

Los neutrófilos infiltrados, como ya se ha comentado, son considerablemente distintos de los aislados en individuos sanos: aparecen degranulados, sobreviven días en lugar de horas y expresan citoquinas y receptores para las mismas diferentes de los habituales (66). Los neutrófilos estimulan la proliferación de células T, ya que expresan MHCs II, por lo que se han propuesto recientemente como nueva diana terapéutica (55, 67). Además son una fuente significativa de leucotrienos y prostaglandinas, principalmente Leucotrieno B4 (LTB4) y prostaglandina E2 (PGE2). El LTB4 es un agente quimiotáctico y actúa reclutando neutrófilos mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular (MAC). Por su parte la PGE2 parece retrasar la apoptosis en los propios neutrófilos (66). Además de todo esto son capaces de activar linfocitos B ya que generan moléculas estimuladoras de linfocitos B y secretan potentes proteasas y citoquinas proinflamatorias (Figura 18) (65).

Tras la migración a la articulación inflamada puede producirse la activación de los neutrófilos mediante su unión a Igs formadoras de los inmunocomplejos presentes en la articulación inflamada ya que expresan en superficie Fc γ R, mediante unión a moléculas de complemento o a través del reconocimiento de antígenos mediante receptores que unen patrones tipo Toll-like receptors. Esta activación

induce la degranulación de los neutrófilos, la liberación de radicales libres de oxígeno producidos por la activación de la NADPH oxidasa ligada a la membrana, mieloperoxidasas, lactoferrina, colagenasas, elastasas y otras proteasas (Tabla 3) que provocan un daño directo sobre el cartílago e inducen la producción de otras citoquinas que alimentan el proceso inflamatorio como el TNF- α o la IL-1 a partir de sus precursores solubles (66, 67).

Tabla 3. Papel de las enzimas procedentes de los gránulos de Neutrófilos en la AR (67).

ENZIMA	FUNCIÓN O DIANA	RELEVANCIA EN AR
Elastasa	Escinde colágeno, elastina, lubricina, pro-citoquinas, receptores anclados a membrana	Promueve daño en el cartílago y activa citoquinas y receptores
Gelatinasa	Escinde colágeno tipo II	Promueve daño en el cartílago
Catepsina	Escinde pro-citoquinas	Activa citoquinas
Lactoferrina	Retrasa la apoptosis, incrementa la adhesión epitelial	Promueve la inflamación
Lipocalina asociada a gelatinasa	Inhibe el factor de crecimiento de condrocitos	Inhibe la reparación del cartílago
Proteinasa 3	Escinde pro-citoquinas	Activa citoquinas
Mieloperoxidasa	Antiproteinasa	Inhibe la resolución de la inflamación
Colagenasa	Escinde colágeno	Promueve daño en el cartílago

En la AR el mecanismo de reclutamiento, activación y la apoptosis de los neutrófilos está alterado. En condiciones normales en ausencia de estímulos los neutrófilos circulantes inician el proceso de apoptosis transcurridas entre 6 y 18 horas. Los restos son fagocitados por macrófagos produciendo mediadores antiinflamatorios. En caso de que no se produzca una limpieza de neutrófilos adecuada se produce una necrosis secundaria que induce la producción de mediadores proinflamatorios por parte de macrófagos cuando fagocitan estos restos. Los neutrófilos de pacientes con AR muestran defectos en la apoptosis independientemente de la duración de la enfermedad y del uso de fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES). Este hecho podría estar relacionado con los niveles de citoquinas anti-apoptóticas: IL-2, IL-4, IL-15, GM-CSF y G-CSF que se encuentran en las articulaciones de pacientes con AR, aunque se desconoce el motivo y se han propuesto otras causas como la expresión de otra citoquina antiapoptótica (MCL-1) secundaria a la hipoxia del tejido o la participación de otros mediadores como la lactoferrina que se encuentra en elevadas concentraciones en el espacio sinovial de pacientes con AR.

Otro factor alterado en los neutrófilos aislados en pacientes con AR es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los

neutrófilos activados generan en elevadas concentraciones ROS a través de la vía NADPH oxidasa mientras que los neutrófilos circulantes apenas tienen capacidad de producir estas especies ya que este complejo se ensambla en la membrana durante el proceso de activación. En el ambiente inflamatorio se produce un estrés oxidativo secundario a la liberación inapropiada de ROS lo que está estrechamente relacionado con el proceso degradativo que se produce en las articulaciones de pacientes con AR. Los neutrófilos aislados a partir de líquido sinovial de pacientes con AR muestran claramente que han iniciado la liberación de estas especies en la articulación. Los radicales libres dañan el ADN, provocan la oxidación de lípidos, proteínas y lipoproteínas y podrían estar implicados en la mutación de inmunoglobulinas que dieran lugar a la expresión de FR (66, 69, 70).

Por otro lado los neutrófilos localizados en zonas inflamatorias expresan CD14, CD83 y MHC II que son moléculas que normalmente solo se expresan en células presentadoras de antígenos, lo que denota que bajo las condiciones adecuadas los propios neutrófilos actúan presentando antígenos activando linfocitos T.

Además los neutrófilos aislados a partir de líquido sinovial de pacientes con AR expresan RANK, osteoprotegerina (OPG), TRAF6 y RANKL mientras que en los aislados en individuos sanos no se

expresa OPG ni RANK. Este hecho justifica la teoría de que los propios neutrófilos podrían afectar al remodelado óseo siendo capaces también de activar la fusión de monocitos para su conversión a osteoclastos activos que actuarían en la resorción del hueso (67).

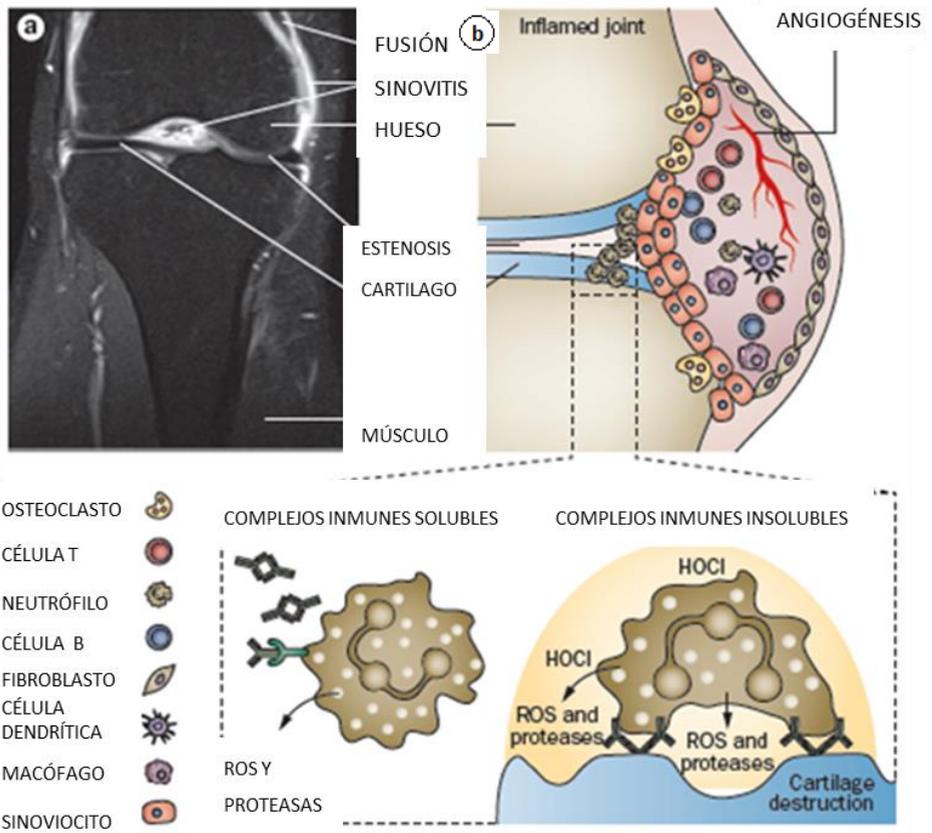


Figura 19. Papel de los neutrófilos en la inflamación articular. a) imagen de resonancia magnética de una rodilla inflamada de un paciente con AR; se muestra pérdida de cartílago, sinovitis y derrame.

b) La inflamación en las articulaciones de pacientes con AR resulta en la formación de *pannus* y en la infiltración de células de la respuesta inmunitaria. Los neutrófilos del líquido sinovial son activados por inmunocomplejos solubles (formados por FR y ACCP) que inducen la degranulación y liberación de proteasas y especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan degradación de ácido hialurónico y la activación de citoquinas proinflamatorias. Los neutrófilos del espacio sinovial también pueden ser activados por inmunocomplejos depositados en el cartílago. En este caso iniciarán una fagocitosis frustrada y liberarán HOCl, ROS y enzimas degradativas de cartílago.

Por otro lado recientemente se ha propuesto una nueva forma de muerte asociada a la eliminación de patógenos por parte de neutrófilos. En esta alternativa los neutrófilos morirían liberando restos de cromatina (ADN asociado a histonas) junto con proteasas y citoquinas presentes en gránulos. A estos restos liberados se les denomina NETs (*neutrophil extracellular traps*) y parecen jugar un papel fundamental en el inicio y desarrollo de la enfermedad ya que para su liberación es necesaria la activación de la NADPH oxidasa que activaría la enzima PADI4 que sería la encargada de la citrulinización de histonas y vimentina responsable del inicio de la formación de los NETs. Por tanto los neutrófilos en su fase final de la vida actuarían participando en el inicio de la enfermedad como productores del antígeno desencadenante (proteínas citrulinadas) y como

perpetuadores de la enfermedad. La producción de NETs es estimulada por la presencia de bacterias y virus y por la influencia de citoquinas como TNF- α , IL-8 e interferón (INF).

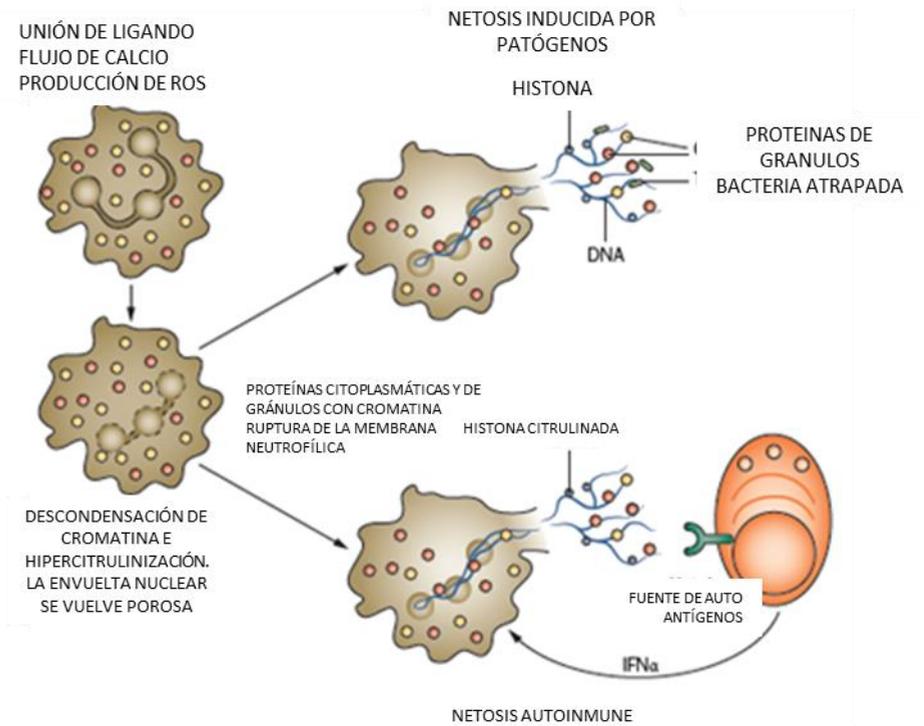


Figura 20. Producción de NETs. La liberación de NETs puede considerarse una forma de muerte celular especializada. El proceso es inducido por la unión de ligandos y depende de flujos de calcio y de la producción de ROS. La cromatina pasa a estar hipercitrulinada lo que provoca su condensación. Los poros presentes en la membrana del núcleo y en las membranas de las vesículas permiten que se mezclen proteínas citoplasmáticas y de las vesículas con la cromatina. Finalmente la membrana celular del neutrófilo se rompe expulsando el NET que se compone de material nuclear (ADN e histonas), de

enzimas granulocíticas (mieloperoxidasa, elastasa, lactoferrina, MMP-9) y proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas sirven como agentes antimicrobianos cuando se producen inducidas por patógenos, pero pueden constituir una fuente de auto anticuerpos cuando se producen asociadas a procesos autoinmunes.

En resumen los neutrófilos en situaciones de inflamación son capaces de interactuar y regular la actividad de otras células; producen mediadores inflamatorios y pueden adquirir diferentes fenotipos como osteoclastos o células presentadoras de antígeno; liberan potentes proteasas, contribuyen a la destrucción de tejido y favorecen la cronificación del proceso inflamatorio con lo que podrían constituir una nueva diana terapéutica.

1.8. Factores genéticos asociados a la enfermedad:

La prevalencia de la AR en la población general es de alrededor del 1%; sin embargo, entre hermanos la prevalencia aumenta al 2-4% y se eleva hasta un 12,3-15,4% entre gemelos homocigóticos. Estos hechos muestran, sin lugar a dudas, que existe una importante contribución del componente genético al desarrollo de la enfermedad (2). A pesar de que la influencia genética en el desarrollo de la enfermedad está clara, hasta el momento se han confirmado 31 locis que sólo explican el 23% del riesgo genético de

sufrir AR y su implicación funcional no ha podido explicarse por completo (28).

Aunque la patogénesis de la AR no está bien establecida se han producido importantes avances en la identificación de los factores genéticos que contribuyen a la aparición de la enfermedad. Como ya se ha comentado previamente, el riesgo genético más importante identificado hasta el momento se encuentra localizado en el antígeno leucocitario humano (HLA). En particular la secuencia de aminoácidos QKRAA, QRRAA o RRRAA en las posiciones 70-74 de la cadena DR β -1 están asociadas con la enfermedad en aquellos pacientes que presentan ACCP positivos (secuencia conocida como epítipo compartido) (2). Por otro lado se han identificado una secuencia (DERAA) situada en esa misma posición que podría conferir protección, aunque los resultados de los estudios son contradictorios hasta el momento. La variedad que sí se ha relacionado más firmemente con la protección frente a la AR con ACCP positivos es la HLA-Dr β *13:01 (2).

Casi treinta años después de la identificación del epítipo compartido se identificó el siguiente gen implicado en el desarrollo de la enfermedad y a partir de entonces se han identificado más de 30 polimorfismos de genes que podrían participar en el desarrollo de la

enfermedad en pacientes con ACCP +. La mayoría de las variedades genéticas identificadas hasta el momento se localizan en genes implicados en vías inmunológicas complejas, normalmente relacionadas con la activación o diferenciación de células B y T y con la señalización de citoquinas. Un ejemplo de este tipo de polimorfismo es el que se produce en el gen PTPN22, que se ha relacionado además con el lupus eritematoso sistémico, responsable de la producción de tirosina fosfatasa que parece afectar al mínimo nivel de estímulo necesario para activar células T y B. Otro ejemplo es el polimorfismo que se produce a nivel de la molécula de superficie CD40 que se relacionó con la AR en 2008. Esta molécula aparece en multitud de células relacionadas con la respuesta inmunitaria (linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) y aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que participa en la enfermedad, su expresión en el espacio sinovial se ha relacionado (71) con la destrucción articular (2).

En cuanto a la AR con ACCP negativos, recientemente se ha sugerido que un polimorfismo en el gen que codifica el neuropéptido S podría condicionar la susceptibilidad y la evolución de la AR, aunque hasta el momento sólo se ha identificado como polimorfismo clave el localizado en HLA-DR3. Sin embargo como ya se ha

comentado previamente el componente genético tiene un peso similar en los dos subtipos de enfermedad; en un estudio reciente se ha demostrado que la heredabilidad de AR entre gemelos con ACCP positivos es del 68% mientras que es del 66% entre gemelos con ACCP negativos. No se han descubierto por el momento polimorfismos que confieran protección frente a la AR con ACCP negativos (2).

En un estudio reciente en el que se relacionan procesos biológicos con dos estudios de asociación genética con la enfermedad (NARAC y WTCCC) se han obtenido y validado nuevas alteraciones genéticas que están relacionadas con la enfermedad. En este estudio se postula que los cambios en genes que codifican proteínas de una misma vía podrían tener un efecto aditivo en la susceptibilidad para sufrir la enfermedad. De este estudio se desprende la importancia que podrían tener la alteración de las señales de los segundos mensajeros a través del AMP cíclico, inositol trifosfato, diacil glicerol o el calcio. Esta señalización está implicada en el ciclo celular, diferenciación, crecimiento, secreción de mediadores y en la respuesta inmunitaria y modula tanto la activación celular como su duración. Los sistemas de señalización de segundos mensajeros controlan las respuestas de células inmunitarias pero también de condrocitos, osteocitos, tejido

conectivo y células endoteliales así como procesos del tipo resorción ósea. Por tanto una alteración del proceso de activación/inactivación podría explicar el anormal comportamiento de las células del tejido conectivo y no sólo las alteraciones en el sistema inmunitario que son las más estudiadas hasta el momento (28).

1.9. Tratamiento de la AR:

El cambio en el paradigma del tratamiento de la AR lo constituye el paso del mero control de síntomas mediante la administración de corticoides y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) al uso de fármacos modificadores de la enfermedad (FAMES) y fármacos biológicos, que realmente actúan alterando la evolución de la patología (3).

Como ya se ha comentado anteriormente el objetivo del tratamiento no es únicamente mejorar los síntomas clínicos como la inflamación, el dolor y la capacidad funcional, también se busca una prevención del daño estructural de la articulación y de la discapacidad a largo plazo mediante la supresión de la actividad de la enfermedad (remisión), así como el control de las comorbilidades asociadas a la misma, especialmente la reducción del riesgo cardiovascular y la prevención de la osteoporosis (3, 4). Para conseguir el objetivo de

prevención y enlentecimiento del progreso de la enfermedad es necesario el uso temprano de fármacos modificadores, este objetivo es fundamental ya que se sabe que la inflamación articular crónica está asociada a una limitación funcional y discapacidad temprana y que las erosiones óseas pueden comenzar en los primeros meses de la enfermedad, siendo el tratamiento temprano la mejor opción para el control adecuado a largo plazo y la prevención del daño estructural (3).

Actualmente el tratamiento precoz y los controles frecuentes que permitan identificar casos de fracaso terapéutico, son las estrategias clave en la clínica reumatológica y son las que aseguran el resultado más óptimo a medio-largo plazo, habiéndose demostrado que la introducción del tratamiento más agresivo en fases iniciales resulta ser coste-efectivo (72).

1.9.1 Terapia Convencional:

1.9.1.1 Antiinflamatorios no esteroideos:

La utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) solos o asociados a los corticosteroides se recomienda en la fase inicial de la artritis, cuando se introduce un nuevo FAME, mientras éste alcanza su nivel de eficacia (generalmente de dos a 12 semanas) o

cuando persisten síntomas a pesar del tratamiento concomitante con los FAME sin que haya indicación de cambio del mismo. Los AINE actúan sobre la producción de prostaglandinas inhibiendo una o las dos isoformas del enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La isoforma COX-1 se encuentra de forma constitutiva en múltiples tejidos como la mucosa intestinal y las plaquetas, mientras que la COX-2 es una enzima inducible que aparece en mayor concentración en tejidos donde se produce un estímulo inflamatorio. Por este motivo se propusieron los inhibidores selectivos como alternativa terapéutica más segura ya que se reduce la toxicidad intestinal. Sin embargo estudios de farmacovigilancia han obligado a la retirada del mercado de algunos fármacos de este grupo ya que se demostró un incremento del riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares graves, junto con un incremento de los casos de hipertensión entre los pacientes tratados con estos fármacos. Estos datos implican que la selección del AINE debe realizarse teniendo en cuenta la patología de base del paciente, evitando producir una lesión o agravar la situación basal.

1.9.1.2 Glucocorticoides:

Los glucocorticoides (GCs) han demostrado tener la capacidad de actuar como modificadores de la enfermedad y no sólo como meros agentes antiinflamatorios. En la artritis temprana tienen la cualidad de

enlentecer el proceso erosivo, mientras que en la AR establecida ayudan al control y el alivio de síntomas (73).

Diversos estudios demuestran que el uso de GCs junto con otro fármaco modificador de la enfermedad supone una mejor respuesta a largo plazo con reducción de las lesiones óseas. Son fármacos con potentes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores y actúan a través de diferentes mecanismos en los que intervienen una gran variedad de células del sistema inmune. Son capaces de inhibir el tráfico leucocitario, interfieren con la función de los leucocitos, fibroblastos y células endoteliales y son capaces de suprimir la acción y producción de factores humorales involucrados en el proceso mediante la inhibición de la transcripción directamente en el núcleo celular (74).

El uso de GCs a dosis bajas (10mg de prednisona o equivalente/día) ha mostrado ser eficaz añadido a otro FAME, aunque su uso prolongado no se recomienda por la incidencia de efectos secundarios a largo plazo como la osteoporosis, cataratas, retención hidrosalina etc. Por lo tanto es recomendable emplearlos durante periodos cortos de tiempo como terapia puente hasta que se alcancen resultados satisfactorios con otros fármacos modificadores de la enfermedad solos o combinados (72).

1.9.2. Fármacos Modificadores de la enfermedad (FAMES):

Los fármacos modificadores de la artritis reumatoide clásicos incluyen moléculas sintéticas como metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina y sulfasalacina, con larga experiencia de uso y resultados muy favorables en el tratamiento de la AR. Sin embargo estos fármacos no son capaces de conseguir la remisión de la enfermedad en todos los pacientes y no están exentos de efectos adversos, algunos graves, como veremos más adelante. La falta de un tratamiento óptimo para un porcentaje elevado de pacientes ha promovido en los últimos años la investigación en este campo, lo que ha derivado en la comercialización de un nuevo grupo de fármacos conocidos como biológicos. Este nuevo grupo de fármacos supone un gran avance en el tratamiento de la enfermedad aunque de nuevo hay una amplia variabilidad en la efectividad alcanzada entre los distintos pacientes y no están exentos de efectos adversos aunque son, en general, mejor tolerados que los FAMES sintéticos.

1.9.2.1 FAMES sintéticos:

El inicio de tratamiento con un FAME sintético debe realizarse tan temprano como se obtenga el diagnóstico de AR, aunque el paciente presente una actividad baja de la enfermedad o incluso se encuentre en remisión (72).

Como ya se ha comentado se deben realizar controles periódicos para determinar la efectividad del tratamiento y en caso necesario intensificar la terapia o realizar un cambio de fármaco. Inicialmente el fármaco de elección según las recomendaciones de la Liga Europea Contra el Reumatismo y de la Sociedad Española de Reumatología (EULAR y GUIPCAR) es el metotrexato y entre las alternativas si hay fracaso o intolerancia incluyen la sulfasalazina, leflunomida, las sales de oro (en desuso) y otros fármacos como los antipalúdicos (cloroquina e hidroxicloroquina).

-Metotrexato (MTX):

Es un fármaco altamente efectivo, sobre todo a dosis altas del orden de 20-30mg semanales. Es considerado la piedra angular del tratamiento de la AR, ya que por sí solo presenta una gran eficacia en el control de los síntomas y además incrementa la eficacia de los FAMEs biológicos. No existe ninguna alternativa sintética que haya mostrado más eficacia (72, 75) a pesar de lo cual existe un porcentaje de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento o que presentan efectos adversos que imposibilitan el tratamiento con MTX (15-30%) (76).

Aunque el mecanismo exacto es desconocido parece actuar como inmunosupresor inhibiendo la proliferación de células inmunitarias e induciendo la apoptosis y como agente antiinflamatorio. Es introducido en la célula por una proteína transmembrana que habitualmente transporta ácido fólico (SLC19A1) y expulsado por acción de un transportador de la familia fijadora de ATP (ABC) también conocida como proteína de resistencia a múltiples drogas. En el interior de la célula el MTX se transforma en derivados poliglutamados (MTXPGs) que inhiben la actividad dihidrofolato reductasa, responsable del paso de dihidrofolato a tetrahidrofolato, sustancia que actúa como donante de carbono clave en la generación de múltiples compuestos, incluyendo la producción de metionina a partir de homocisteína; los restos MTXPGs también bloquean la enzima timidilato sintetasa (TYMS) lo que inhibe la síntesis de novo de bases pirimidínicas. Por otro lado tanto metotrexato como sus metabolitos bloquean la actividad AICAR transformilasa (codificada por el genATIC) lo que produce un aumento de la concentración del ribonucleótido aminoimidazol carboxamida adenosina (AICA) que en exceso bloquea la actividad de enzimas importantes en el metabolismo de adenosina (Figura 21) (77), con lo que esta última se acumula y actúa como un potente

antiinflamatorio: inhibe la acumulación de leucocitos y el daño endotelial inducido por neutrófilos en el foco inflamatorio, reduce la producción de TNF- α e inhibe varias actividades llevadas a cabo por macrófagos, células T y células natural killer. El déficit de bases nitrogenadas por otro lado, impide la proliferación celular, mientras que el déficit de metionina impide la producción de poliamidas, que parecen jugar un papel importante en patologías inflamatorias (75). Por otro lado aunque se desconoce el mecanismo parece actuar como promotor de la producción de antagonista del receptor de la IL-1 e inhibidor de la síntesis de la propia IL-1.

pacientes en los que no existe una buena tolerancia por vía oral o en los que no exista una buena respuesta a pesar del uso de dosis elevadas ya que la absorción oral es errática.

Los efectos adversos más frecuentes se producen a nivel hepático, sobre todo en pacientes con tratamientos prolongados y elevadas dosis acumuladas, aunque también pueden producirse a nivel gastrointestinal, cutáneo, pulmonar (neumonitis), hematológico (leucopenia, trombocitopenia y pancitopenia que requiere retirada inmediata y tratamiento con ácido fólico), del sistema nervioso central y del sistema inmunitario. En general estos efectos adversos obligan retirar el fármaco únicamente en un 20-30% de los pacientes ya que suelen ser leves. Las alteraciones gastrointestinales suelen aparecer durante los primeros 1 ó 2 años del tratamiento y se caracterizan por dispepsia, náuseas, diarrea, anorexia y estomatitis que en general remiten con reducciones de dosis. Otro efecto adverso habitual es la elevación de enzimas hepáticas que puede remitir espontáneamente o requerir una retirada indefinida del tratamiento si se mantienen elevadas a pesar de un descanso terapéutico por el riesgo que implica que se produzca una alteración estructural y un daño hepático irreversible. Es recomendable realizar controles hematológicos y de transaminasas periódicamente durante el

tratamiento con metotrexato y se ha recomendado administrar suplementos de ácido fólico o folínico para reducir la incidencia de estos efectos adversos (75).

-Leflunomida:

Aunque la Liga Europea de reumatología la sitúa en un segundo plano (72) en el tratamiento de la AR, la Sociedad Española de Reumatología (SER) y el Colegio Americano de Reumatología posicionan la leflunomida en el mismo escalón del tratamiento que metotrexato ya que existe también una amplia experiencia de uso y efectividad demostrada (78, 79).

Se trata de un derivado isoxazólico químicamente diferente a todos los fármacos inmunosupresores disponibles en el momento de su comercialización. Es un profármaco que pasa a su forma activa (A771726) en el tracto gastrointestinal. Su mecanismo de acción es variado, parece actuar a diferentes niveles del proceso inflamatorio del espacio sinovial. Actúa inhibiendo la dihidroorato deshidrogenasa enzima imprescindible para la síntesis de pirimidinas necesarias para completar el ciclo celular de linfocitos T con lo que bloquea la expansión clonal de estos linfocitos. Además es antagonista de la acción de numerosas citoquinas y factores de crecimiento (IL-2,

IL-4, IL-3, IL-6, TNF- α , GM-CSF, G-CSF) y bloquea la producción de autoanticuerpos a través de la inhibición de la enzima tirosinkinasa (80).

La dosis de mantenimiento recomendada es de 10 a 20mg de leflunomida una vez al día dependiendo de la gravedad (actividad) de la enfermedad y se puede iniciar con una dosis de carga de 100mg durante tres días. El efecto terapéutico aparece normalmente a las 4-6 semanas del inicio del tratamiento.

Los efectos adversos más frecuentes de la leflunomida son los gastrointestinales (diarrea 17%, náuseas 9% y dolor abdominal 6%) y los del aparato respiratorio (infección de vías aéreas superiores 15% y bronquitis 7%). Suelen ser leves y no obligan en general a suspender el tratamiento. Se han descrito elevaciones transitorias de transaminasas en el 5% aproximadamente de los pacientes con AR tratados con leflunomida (81). En general, son elevaciones ligeras que tienden a remitir con el tratamiento prolongado. Sin embargo, si se mantienen elevadas es necesario suspender el tratamiento y administrar colestiramina para aumentar la eliminación del fármaco. Se han notificado casos de daño hepático grave, algunos con desenlace mortal, aunque son raros.

Otros efectos adversos son la hipertensión (10%), cefalea (7%), vértigo (4%), pérdida de peso (4%), alopecia reversible (1%) y es potencialmente teratogena con lo que es necesario adoptar medidas anticonceptivas adecuadas durante el tratamiento.

-Sulfasalazina:

La sulfasalazina es un fármaco ampliamente utilizado como FAME tanto en monoterapia como en combinación con otros fármacos antirreumáticos. El Colegio Americano de Reumatología y la Sociedad Española de Reumatología recomiendan su uso en monoterapia en la AR de inicio sin marcadores de mal pronóstico (erosiones radiológicas, FR, anticuerpos anti-CCP, ausencia de enfermedad extra-articular, HAQ superior a 1 o elevada carga inflamatoria (78, 79)), mientras que la Liga Europea de Reumatología recomienda su uso, al igual que el de Leflunomida, en caso de contraindicación o intolerancia a metotrexato (72). Tras ser ingerido es biotransformado por bacterias intestinales en mesalazina (ácido 5-aminosalicílico) y sulfapiridina, principales responsables de su efecto a nivel intestinal en la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Aunque su mecanismo de acción en la AR no está claro, parece que es capaz de activar caspasas que inducen la apoptosis de macrófagos y

linfocitos, de inhibir la expresión de TNF- α mediante la inactivación del factor de transcripción NF- κ B (82) y de inhibir la producción de bases púricas (83).

Los efectos adversos más frecuentes ocurren en el sistema nervioso central (cefalea, vértigo) y gastrointestinal (anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal), en general son leves y no requieren la suspensión del tratamiento. También puede producir toxicidad hematológica (macrocitosis, leucopenia, neutropenia y anemia megaloblástica) y hepática que se manifiesta con cuadros agudos, febriles, con lesiones cutáneas pruriginosas, linfadenopatía, hepatomegalia, linfocitosis, eosinofilia y elevación de transaminasas.

- Antipalúdicos (AP): Hidroxicloroquina y cloroquina:

Se trata de fármacos antimaláricos empleados en el tratamiento de la AR sobre todo en combinación con otros FAMES. Muestran eficacia en el control de los signos y síntomas pero no en la mejora de la evolución a largo plazo. Pueden considerarse como alternativa en aquellos pacientes con actividad baja de la enfermedad y sin factores de mal pronóstico.

Actúan alterando la respuesta inmunitaria específica. En condiciones normales en el proceso de la presentación de antígenos, el

péptido antigénico es transportado al interior del macrófago y es procesado en vesículas intracitoplásmicas, uniéndose a las cadenas α y β de los antígenos HLA de clase II. Una vez procesada esta unión, el complejo es externalizado a la superficie celular donde contacta con el linfocito T CD4+ dando lugar a la respuesta inmunitaria con liberación de IL-1, IL-6 y TNF. Cuando el AP difunde al interior de las vesículas, aumenta el pH e imposibilita la reacción de unión del péptido antigénico con las cadenas α y β de las moléculas HLA de clase II, lo que impide su exposición en la superficie celular y, por tanto, frena la respuesta inmunitaria. Este proceso sólo ocurre para los autoantígenos pues de otra manera no preservaría la respuesta inmunitaria defensiva.

Se han descrito gran variedad de efectos adversos, siendo los más frecuentes, gastrointestinales (10%) y cutáneos (3%), que son afortunadamente los menos graves y pueden controlarse con disminución de la dosis. Los APs actúan como estimulantes de la corteza cerebral por lo que hay que vigilar especialmente a los pacientes en situación de potencial excitabilidad como trastornos bipolares y epilépticos ya que pueden desencadenar cuadros patológicos. La toxicidad más grave es la ocular (retinopatía) y a la muscular (cardiomiopatía y la neuromiopatía) aunque en general son

poco frecuentes. Otros acontecimientos más raros son las discrasias sanguíneas con cloroquina en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y la disminución de la función renal.

1.9.2.2. FAMES biológicos:

En los últimos años se ha producido una gran evolución en la terapia de las enfermedades autoinmunes. La investigación básica ha permitido conocer parte de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la respuesta inmunitaria lo que ha posibilitado la síntesis de moléculas mucho más específicas dirigidas a frenar la respuesta exagerada y dañina que se produce en este tipo de patologías. Los fármacos biológicos se definen como productos utilizados en el tratamiento de enfermedades elaborados a partir de células cultivadas en bancos celulares, con la excepción de metabolitos microbianos. Estas terapias han sido diseñadas de manera que actúan específicamente sobre una diana terapéutica considerada importante en el proceso patogénico de la enfermedad.

Actualmente en España hay nueve fármacos biológicos autorizados para el tratamiento de la artritis reumatoide. Cinco están dirigidos a bloquear la actividad del TNF- α : infliximab, adalimumab, golimumab que son anticuerpos monoclonales frente al TNF- α , certolizumab que está compuesto por la fracción variable (Fab) de una

IG pegilada y etanercept que es una proteína de fusión estructuralmente análoga al receptor p75 (receptor tipo II del TNF- α) (Figura 22). Estos fármacos se unen al TNF y bloquean su actividad. Son efectivos en el control de los síntomas, normalización de las concentraciones séricas de reactantes de fase aguda y en la remisión del daño observado mediante radiografía (84-86), lo que mejora la calidad de vida de los pacientes (87). Dada su diferente estructura y la posibilidad de que se generen anticuerpos que bloqueen su actividad y comprometan por tanto su efectividad todos ellos se consideran indispensables en el arsenal terapéutico y el fracaso de uno de ellos no compromete la efectividad de los demás (79).

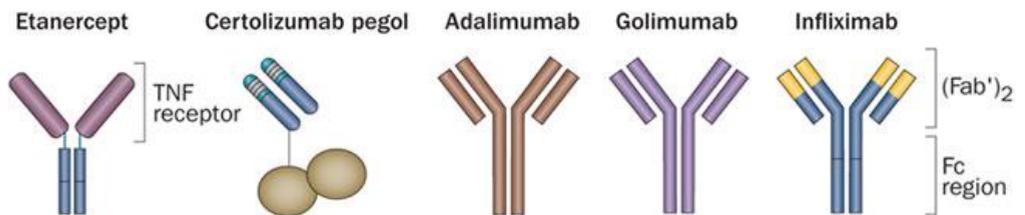


Figura 22. Estructura de los cinco fármacos anti-TNF autorizados para el tratamiento de la AR en España en 2013 (88).

Los demás fármacos biológicos bloquean la respuesta inmunitaria a distintos niveles: Abatacept es una proteína de fusión

que modula selectivamente una señal co-estimuladora clave para la activación completa de los linfocitos T que expresan CD28; Anakinra es una proteína recombinante que actúa como antagonista de los receptores de la IL-1; Rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une específicamente a los receptores CD20 presentes en la superficie de linfocitos B; Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a los receptores de IL-6 tanto solubles como unidos a membranas (Figura 23).

La SER recomienda el inicio del tratamiento con un fármaco biológico tras el fracaso o intolerancia a al menos un FAME tradicional (preferentemente LEF o MTX) y sólo en situaciones excepcionales recomienda el inicio de tratamiento con un fármaco biológico. Se recomienda iniciar tratamiento biológico con un fármaco anti-TNF o con tocilizumab en combinación con metotrexato o en monoterapia en caso de intolerancia (79).

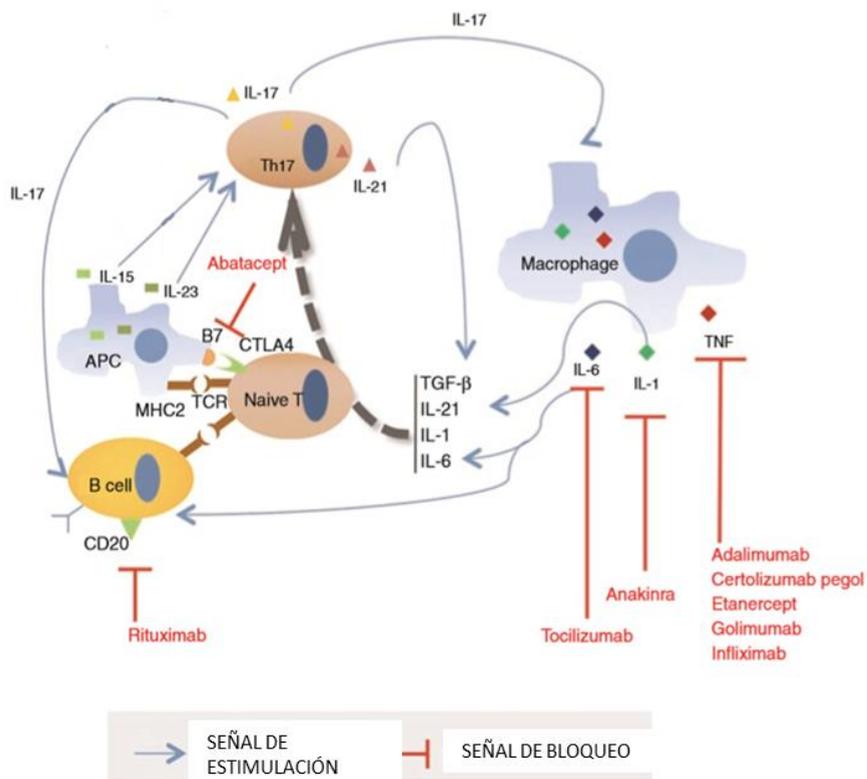


Figura 23. Dianas terapéuticas de los nueve fármacos biológicos autorizados para el tratamiento de la AR en España en 2014 (3).

En la tabla 4 se muestran las nueve alternativas terapéuticas comercializadas en España en 2014 con sus características básicas:

Tabla 4. Principales características de los fármacos autorizados para el tratamiento de la AR en España en 2014.

PRINCIPIO ACTIVO	POSOLOGÍA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	INDICACIONES APROBADAS EN ESPAÑA (2014)	DIANA TERAPÉUTICA
Abatacept	500-1000mg Semana 1-2-4 y c/4 semanas	IV	Artritis Reumatoide Artritis idiopática juvenil (en combinación con metotrexato)	Unión específica a CD80 y CD86 de células presentadoras.
Adalimumab	40mg c/ 7-15 días	SC	Espondilitis anquilosante Psoriasis Enfermedad de Crohn Colitis ulcerosa Artritis reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica al TNF- α .
Anakinra	100mg c/24 horas	SC	Artritis Reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión al IL-1R. Inhibición competitiva de IL- 1 α e IL-1 β .
Certolizumab	400 mg c/ 2 semanas	SC	Artritis Reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica al TNF- α .
Etanercept	50mg c/7 días	SC	Artritis idiopática juvenil Artritis psoriásica Espondilitis anquilosante Psoriasis en placas Artritis reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica al TNF- α .

PRINCIPIO ACTIVO	POSOLOGÍA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	INDICACIONES APROBADAS EN ESPAÑA (2014)	DIANA TERAPÉUTICA
Golimumab	50mg c/4 semanas	SC	Espondilitis anquilosante Artritis psoriásica Artritis reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica al TNF- α .
Infliximab	3 mg/kg semanas 1-2 y 6 y c/8 semanas	IV	Enfermedad de Crohn Colitis ulcerosa Espondilitis anquilosante Artritis psoriásica Psoriasis Artritis reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica al TNF- α .
Rituximab	1000mg semanas 1 y 2 y c/24 semanas	IV	Linfoma no Hodking Leucemia Linfática Crónica Artritis Reumatoide (en combinación con metotrexato)	Unión específica a CD20 de linfocitos B.
Tocilizumab	8mg/kg c/8 semanas	IV	Artritis Reumatoide y artritis idiopática juvenil sistémica (en combinación con metotrexato)	Unión específica a los IL-6Rs e IL-6Rm. Inhibición competitiva de IL-6.

Nota: IV: vía de administración Intravenosa; SC: vía de administración subcutánea.

1.10 Farmacogenética de la AR:

Como ya se ha comentado el componente genético tiene un papel fundamental en el desarrollo de la AR y también contribuye al desarrollo de resistencia a las terapias. Las alteraciones genéticas que influyen en la respuesta a los fármacos incluyen polimorfismos en genes que codifican enzimas metabolizadoras, transportadores transmembrana y dianas terapéuticas. El conocimiento de estos cambios genéticos permite optimizar el tratamiento mediante la individualización del mismo (77). El elevado coste del tratamiento biológico y el hecho de que actualmente hay un 20-40% de pacientes con AR que no responden a este tipo de terapia ha motivado la búsqueda de predictores de respuesta y toxicidad con el fin de reducir costes y efectos adversos innecesarios (88).

Actualmente no existen pruebas genéticas validadas que ayuden al clínico a dirigir el tratamiento en la AR aunque se han identificado algunos polimorfismos que afectan a proteínas implicadas en el mecanismo de acción de algunos fármacos:

1.10.1 Farmacogenética de los FAMES sintéticos:

-Metotrexato:

Las variantes genéticas identificadas hasta el momento que condicionan la efectividad/ toxicidad de metotrexato van a modificar proteínas relacionadas con su propio mecanismo de acción como son las implicadas en síntesis de folatos, transportadores del fármaco y la síntesis de nucleótidos (Tabla 5). El cambio de una citosina por una timina en la posición 677 del gen que codifica la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTXFR 677C>T) es la que con más firmeza se ha relacionado con aumentos de toxicidad siendo reproducible en más de un estudio.

Tabla 5. Variantes genéticas identificadas relacionadas con la eficacia/toxicidad de metotrexato en el tratamiento de la AR.

GEN PRODUCTO Y PAPEL	VARIANTE	EFECTOS CELULARES DE LA VARIANTE	EFECTOS CLÍNICOS OBSERVADOS
Síntesis de folatos.			
SLC19A1 (transportador de folato y MTX al interior de la célula)	80G>A	Aumentan los niveles intracelulares de MTX – poliglutamato.	Asociado con un incremento de eficacia en un estudio (89).
MTHFR (síntesis de 5-metil tetrahidrofolato)	677C>T	Produce una enzima MTHFR termolábil: reduce los niveles de enzima.	Asociado a aumento de toxicidad en 4 estudios (90-93).

Variantes en proteínas transportadoras.			
ABCB1, MDR1, bomba de expulsión de fármaco	1420C>T	Aumenta la expulsión de metotrexato.	Asociado en un estudio con una reducción de la eficacia (93).
GEN PRODUCTO Y PAPEL	VARIANTE	EFFECTOS CELULARES DE LA VARIANTE	EFFECTOS CLÍNICOS OBSERVADOS
Variantes en la síntesis de nucleótidos.			
TYMS conversión de dUMP a dTMP en la síntesis de pirimidinas (inhibida por MTXPGs)	Elemento repetido 5'UTR	Aumento de actividad TYMS.	Asociado en 2 estudios con una reducción de la eficacia (89, 94).
GEN PRODUCTO Y PAPEL	VARIANTE	EFFECTOS CELULARES DE LA VARIANTE	EFFECTOS CLÍNICOS OBSERVADOS
Variantes en la síntesis de nucleótidos.			
ATIC, PURH formilación de AICAR durante la síntesis de purinas (inhibida por MTXPGs)	347C>G	Altera la actividad enzimática y aumenta los niveles de AICAR	Asociado en 2 estudios con un aumento en la eficacia (89, 95) y con aumento en la toxicidad (93, 95).

- Leflunomida:

Actúa bloqueando la actividad de la dihidroorato deshidrogenasa (DHODH) imprescindible para la síntesis de pirimidinas tal y como se ha comentado. La secuencia genética que codifica esta enzima está muy conservada y sólo se conoce un polimorfismo que implica pérdida de sentido en el primer exón

(19C>A) lo que modifica la composición de la enzima (paso de lisina a glutamina en el extremo N-terminal) (77, 96). Este polimorfismo se ha relacionado con un aumento de la eficacia en aquellos pacientes portadores de la variante DHODH 19C aunque también con el aumento de la toxicidad asociada al fármaco (77). Por otro lado para la producción del fármaco activo (se trata de un profármaco) es necesaria la actividad del citocromo CYP1A2 y el genotipo CYP1A2*1F CC se ha relacionado con un incremento de casi 10 veces el riesgo de sufrir toxicidad cuando se compara con la variedad CYP1A2*1F A (96).

- Sulfasalazina:

Como ya se ha explicado la molécula de sulfasalazina es biotransformada en el intestino generándose ácido 5-aminosalicílico y sulfapiridina. La sulfapiridina absorbida es metabolizada en hígado. En primer lugar es acetilada por acción de la arilamina N-acetiltransferasa 2 (NAT-2) cuyo gen es polimórfico. El 40-70% de los individuos son homocigotos o heterocigotos compuestos para el polimorfismo NAT2 que condiciona la capacidad “acetiladora” de los individuos haciéndolos acetiladores rápidos o lentos. Los acetiladores lentos pueden experimentar mayor grado de toxicidad provocado por

la sulfasalazina. Sin embargo el bajo número de pacientes estudiados no permite establecer una relación causa-efecto consistente (77, 96).

-Hidroxicloroquina:

Tras la administración oral se absorbe rápidamente y se metaboliza en el hígado a través del citocromo P450 (CYP-450) a su metabolito activo que difunde a endosomas y lisosomas donde actúa aumentando el pH e inhibiendo la presentación de antígenos. Actualmente no se han demostrado polimorfismos en el complejo CYP-450 que influyan en la toxicidad o eficacia de la hidroxicloroquina. Se han estudiado polimorfismos en los genes que codifican las interleukinas como TNF- α e IL-10 con el objetivo de predecir la respuesta a los antipalúdicos en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, sin embargo no existen datos suficientes que permitan guiar el uso de estos fármacos en el tratamiento del lupus o de la AR.

1.10.2 Farmacogenética de los FAMES biológicos:

Los estudios llevados a cabo aún no han permitido validar variantes genéticas que puedan emplearse como marcadores de respuesta a la terapia biológica al igual que ocurría con los FAMES sintéticos. A continuación se detallan las variantes genéticas que por

el momento se han propuesto como posibles condicionantes de la actividad/toxicidad de los fármacos biológicos.

-Farmacogenética de los antagonistas del TNF- α :

Se han identificado múltiples polimorfismos en el locus que codifica el TNF- α , incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las posiciones -308 y -238 de la región promotora y un SNP en la posición +489 (97). Algunos estudios sugieren que los polimorfismos en la región promotora podrían influenciar los niveles circulantes de TNF- α mientras que otros estudios no han podido establecer esta relación (98, 99). Un meta-análisis reciente en el que se estudió el polimorfismo -308 G/A mostró que existe una mejor respuesta a este grupo de fármacos en los pacientes portadores del alelo G (OR=1.87, 95% IC 1.26-2.79) (100). Aunque no afecta a la transcripción del TNF- α , el SNP en la posición +489 parece ser un marcador de agresividad de la enfermedad, así la variante 489AA parece ser un factor protector de enfermedad severa (77).

Entre los receptores del TNF- α (TNF-R) también se han identificado ciertos cambios genéticos que condicionan la actividad de esta citoquina. Concretamente un SNP situado en el exón 6 de la

región que codifica el TNF-R1 (TNFRSF1A) condiciona la cantidad circulante de TNF- α e incrementa la producción de IL-6 (101).

Por otro lado los fármacos anti-TNF que tienen estructura de anticuerpo (adalimumab, golimumab e infliximab) poseen una fracción constante (Fc γ) que se fija al receptor Fc γ R y de esta interacción depende la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo artificial que con frecuencia se ve condicionada por el elevado polimorfismo del gen que codifica este receptor. Un SNP en FCGR3A codifica la variante Valina158Fenilalanina del Fc γ R3A que influencia la fijación de la Fc de la IgG1 y por tanto la citotoxicidad mediada por anticuerpo artificial y la apoptosis: la variante valina158 tiene mayor afinidad por la Fc IgG1 y promueve la citotoxicidad mediada por anticuerpo artificial (102). Algunos estudios sugieren que además de determinar la toxicidad al tratamiento este polimorfismo podría determinar la susceptibilidad y severidad de la enfermedad aunque los datos son controvertidos (103-105). Sin embargo el hecho de que el polimorfismo FCGR3A determina la actividad anti-TNF- α ha sido demostrado en varios estudios desarrollados en pacientes con Enfermedad de Crohn donde se vio que los pacientes homocigotos para el genotipo que codifica valina en la posición 158 tenían mejor respuesta anti-inflamatoria (106).

En un estudio llevado a cabo en pacientes con AR, espondilitis anquilosante y artritis psoriásica se observó que el polimorfismo del gen promotor del TNF- α -308G estaba relacionado con la respuesta a etanercept, infliximab y adalimumab (107) siendo además predictor de respuesta a adalimumab en otro estudio desarrollado en pacientes con AR (108). Sin embargo un meta-análisis posterior sobre los SNPs en la región promotora del TNF- α y su influencia en la respuesta a fármacos anti-TNF no pudo establecer esta relación y sólo identificó una asociación marginal entre la respuesta a infliximab y el SNP de la región promotora en la posición -238 (109).

De forma similar el genotipo TT del polimorfismo TNFRSF1B 196 T>G se mostró como predictivo de la respuesta a etanercept e infliximab en un estudio desarrollado en pacientes de AR (110) mientras que en un estudio de cohortes posterior esta relación no pudo establecerse (111).

Por otro lado, más recientemente se ha desarrollado un estudio de asociación de genoma completo en el que se ha identificado un polimorfismo de un único nucleótido en la posición 1q del cromosoma 23 que se relaciona con la respuesta a etanercept medida como la variación en el nivel del DAS28. Este polimorfismo implica una mayor expresión del gen que codifica la proteína CD84 en células

mononucleares de sangre periférica y se ha relacionado con una mejor respuesta a etanercept aunque no a infliximab ni a adalimumab. Los autores del estudio concluyen que la expresión de esta molécula podría ser un marcador útil de respuesta al tratamiento con etanercept en pacientes con AR (112).

2. Hipótesis y Objetivos:

2.1 Hipótesis.

La hipótesis de este trabajo de tesis doctoral se basa en los siguientes antecedentes:

- 1) La AR es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, poligénica y multifenotípica, donde intervienen múltiples células y proteínas proinflamatorias que presentan una activación alterada.
- 2) El diagnóstico temprano que permita un inicio precoz del tratamiento de la enfermedad es clave en la evolución de la patología, ya que el remodelado del tejido óseo y de las articulaciones suele ser irreversible.
- 3) Existe una amplia variabilidad interindividual e intraindividual en la respuesta farmacológica de la AR así como de la toxicidad asociada al tratamiento.
- 4) Múltiples estudios han mostrado una relación entre la carga genética y la susceptibilidad de padecer la enfermedad, así como la respuesta/ toxicidad asociadas al tratamiento de la AR.
- 5) Los neutrófilos constituyen las células más abundantes en el líquido sinovial de las articulaciones inflamadas de pacientes

con AR y presentan en estos pacientes unas características fenotípicas distintas a los aislados a partir de individuos sanos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral es la siguiente:

Los pacientes con artritis reumatoide presentan alteraciones de la distribución de polimorfismos genéticos de genes involucrados en procesos inflamatorios, autoinmunes y de remodelado del tejido osteoarticular. Así mismo, los neutrófilos, como célula inflamatoria de la inmunidad innata, pueden estar activados y participar en el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, la respuesta y toxicidad al tratamiento puede verse condicionada por la dotación genética de cada individuo y el conocimiento de la misma podría ayudar a dirigir la terapia, tanto en la indicación como en la dosificación.

2.2 Objetivos.

El objetivo del estudio es la búsqueda de marcadores genéticos que permitan realizar un diagnóstico temprano de la AR, así como conocer la respuesta / toxicidad al tratamiento con metotrexato y con fármacos anti-TNF. Así mismo, se analizará el estado de

activación de los neutrófilos en pacientes con AR y su influencia sobre la respuesta y/o toxicidad al tratamiento.

Para alcanzar dichos objetivo se han establecido los siguientes subestudios:

- 1) Estudio casos-contrroles comparando el genotipo de sujetos sanos con el de pacientes buscando polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) de los genes *MTHFR*, *SLCO1B1*, *TNF- α* , *TNFRSF1 β* , *IL-10*, *IL-4*, *FCGR3A*, *FCGR2A*, *STAT4*, *PTPN22*, *IL-6* y su receptor soluble (*IL-6 Rsol*) y *PDZD2* para determinar si alguno de los alelos se encuentra asociado significativamente a la posibilidad de presentar la enfermedad en nuestra población.
- 2) Estudio de casos control de expresión en neutrófilos procedentes de sangre periférica de los genes *FCGR3A*, *FCGR3B*, *STAT4*, *JAK2*, *TNF- α* , *TGF β 1*, *IL-10* y *MMP-9*, relacionados con el grado de activación de los mismos y su posible asociación con la enfermedad en nuestra población.
- 3) Estudio de asociación entre los polimorfismos de los genes antes descritos y el grado de activación de neutrófilos con las variables clínicas propias de la enfermedad.

- 4) Estudio de asociación entre los polimorfismos estudiados y el grado de expresión en neutrófilos con la respuesta/ toxicidad a los tratamientos de estudio.

3. Material y Métodos:

3.1 Material.

3.1.1 Pacientes y sujetos sanos.

Los sujetos empleados como controles fueron reclutados por la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia desde la Unidad de Investigación Clínica previa aceptación y firma del consentimiento informado una vez leída la hoja de información al paciente de este estudio (Anexos I y II). Los pacientes con AR fueron reclutados en el Servicio de Reumatología del CHGUV. Todos ellos fueron informados por escrito y verbalmente y firmaron el consentimiento informado (Anexos I y II). Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Anexo III). El tamaño muestral no se calculó debido a la gran variabilidad de las frecuencias en la población general de los polimorfismos estudiados. En su lugar se reclutaron todos los pacientes tratados por el participante en el estudio en tratamiento con FAMES y anti-TNF durante el periodo de 4 años (diciembre de 2010 - enero de 2014). El número de pacientes reclutado fue de 96 pacientes y 84 individuos sanos para los subestudios de genotipado y de 62 pacientes y 44 individuos sanos para los subestudios de expresión en neutrófilos.

Ninguna de las estrategias terapéuticas fue modificada en base a los resultados del estudio ya que se trata de un estudio observacional. Además todas las muestras procesadas fueron anonimizadas. En el apartado de “Diseño del estudio” se describe detalladamente todos los pasos seguidos.

3.1.2 Muestras biológicas.

Para llevar a cabo los distintos sub-estudios fue necesaria la extracción de sangre periférica para lo cual se empleó la técnica rutinaria de extracción en analíticas de control obteniéndose 9 ml de sangre venosa por paciente e individuo sano que se almacenaron hasta su procesamiento en tubos con citrato sódico, anticoagulante reversible que se emplea habitualmente en la práctica clínica. Un mililitro de cada muestra fue procesado para llevar a cabo el estudio genético mediante una prueba de discriminación alélica como se detalla más adelante y los 8 restantes se emplearon en el estudio de expresión en neutrófilos.

3.1.3 Reactivos y Kits utilizados.

Los reactivos y kits utilizados para la extracción de ADN y para la amplificación del mismo y la transcripción de RNA se detallan

en la tabla 6. Los kits y reactivos necesarios para llevar a cabo las demás técnicas instrumentales se detallan en cada uno de los apartados de este estudio.

Tabla 6. Kits y reactivos empleados en la extracción y amplificación de ADN y en la transcripción de RNA a ADN.

KIT UTILIZADO	FUNCIÓN	CASA COMERCIAL Y REFERENCIA
ADN QiA amp ADN-Blood Mini-Kit (250)	Extracción de ADN en sangre venosa	QiAgen QIAmp Ref. 51106
Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos (<i>Nucleic Acid Purification Lysis Solution</i>)	Extracción de ADN y ARN en sangre venosa	Applied Biosystems Ref. 4305895
TaqMan GTX Expression Master Mix	Amplificación de ADN y ADNc por PCR real time	Applied Biosystems Ref. 4369016
TaqMan reverse transcription reagents	Transcripción de RNA a ADNc	Applied Biosystems Ref. 4306974

3.2 Diseño.

3.2.1 Diseño de los subestudios.

El presente trabajo de tesis consta de tres subestudios:

3.2.1.A) Subestudio casos-contróles:

Estudio casos-contróles en el que se incluyeron sujetos sanos en el grupo control y sujetos diagnosticados de AR en tratamiento

actual con FAMES sintéticos o biológicos en el grupo de casos. Se recogieron variables demográficas, clínicas y de respuesta/toxicidad al tratamiento de todos los pacientes.

Los criterios de inclusión y de exclusión de los sujetos sanos y de los pacientes con AR se detallan en las tablas 7 y 8 respectivamente:

Tabla 7. Criterios de inclusión y exclusión para sujetos sanos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN EL GRUPO CONTROL	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN EN EL GRUPO CONTROL
Sujeto sano.	Presencia de proceso inflamatorio crónico o agudo durante el reclutamiento.
Mayor de 18 años.	Rechazo del consentimiento informado.

Tabla 8. Criterios de inclusión y exclusión para pacientes con AR.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN EL GRUPO DE AR	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN EN EL GRUPO DE AR
Diagnóstico de AR.	Presencia de otras enfermedades inflamatorias concomitantes.
Mayor de 18 años.	Rechazo del consentimiento informado.
Tratamiento activo con FAMES un mínimo de 2 años.	

Los sujetos sanos del grupo control fueron reclutados en la Unidad de Investigación Clínica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia en el área 9 del departamento de salud de Valencia.

Los pacientes del grupo de AR fueron diagnosticados en el Servicio de reumatología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y reclutados para el estudio durante el periodo 2010-2014.

A cada uno de los sujetos sanos y de los pacientes se le realizó una extracción de sangre venosa periférica para aislar neutrófilos para el estudio de expresión de marcadores de activación en casos *vs.* controles, y para obtener leucocitos para aislar ADN para realizar el estudio de genotipado casos *vs.* controles. De esta manera se comparó

la distribución de los polimorfismos genéticos (descritos más adelante) entre casos y controles, así como la expresión de diferentes genes en neutrófilos de sujetos sanos vs. pacientes con AR.

3.2.1.B) Subestudio de asociación genética y expresión en neutrófilos con variables clínicas:

El segundo subestudio se realizó en pacientes diagnosticados de AR. Se trata de un estudio observacional de corte transversal en el que se reclutaron pacientes diagnosticados de AR en tratamiento activo con FAMES sintéticos o biológicos durante al menos 2 años. Los pacientes reclutados fueron los mismos que los reclutados en el grupo de AR del primer subestudio. Se recogieron las variables demográficas, clínicas y de evolución de la enfermedad. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los mismos que los definidos en el apartado anterior para el grupo de AR. A cada uno de los pacientes se le extrajo sangre venosa periférica para la obtención de ADN y el aislamiento de neutrófilos. Se estudió la posible asociación tanto del perfil genético como de la expresión de genes en neutrófilos con las diferentes variables clínicas y demográficas.

3.2.1.C) Subestudio de asociación genética y de expresión en neutrófilos con la respuesta y toxicidad al tratamiento:

El tercer subestudio se realizó también en pacientes diagnosticados de AR. Se trata de un estudio retrospectivo de corte transversal en el que se pretende ver la posible correlación entre los polimorfismos genéticos de los pacientes y la respuesta y/o toxicidad al tratamiento, así como la posible correlación entre la expresión en neutrófilos con la respuesta y/o toxicidad al tratamiento. La población de estudio fue la misma que el grupo de casos de los subestudios 1 y 2.

Todos los sujetos sanos y pacientes participantes en el estudio fueron informados y proporcionaron su consentimiento por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

El proyecto se realizó bajo las directrices recogidas en la declaración de Helsinki, convenio de consejo de Europa relativo a los derechos humanos y biomedicina, la declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos y los requisitos establecidos en la legislación Española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y

la bioética. A su vez el estudio respeta la legislación general y autonómica sobre protección de datos personales LEY ORGÁNICA 15/1999, así como los referentes a los derechos y obligaciones en materia de información y documentación sanitaria.

3.2.2 Variables demográficas y clínicas.

La muestra estudiada pertenece al área de adscripción del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Se recogieron datos demográficos como la edad, el sexo y el hábito tabáquico. El consumo de tabaco se calculó mediante la fórmula paquetes-año (PAQ/AÑO) en la cual un paquete-año es igual a un año fumando 20 cigarrillos al día.

Por otro lado se obtuvieron datos relacionados con la enfermedad: fecha de inicio de la misma definida como la fecha en que se realizó el diagnóstico por primera vez así como la aparición de alteraciones clínicas propias de la patología. Se registró la presencia de variables clínicas propias de la enfermedad:

1. Nódulos reumatoideos: Se trata de esferas de 1 a 5 centímetros de diámetro formadas principalmente por colágeno y fibrina que se localizan más frecuentemente en zonas de flexión y roce como los codos.

2. Vasculitis: Inflamación de los vasos sanguíneos que puede generar necrosis tisular en los casos más graves.
3. Manifestaciones cardiovasculares: Pericarditis, miocarditis, valvulitis, arterosclerosis.
4. Alteraciones oculares: Queratitis, escleritis y epiescleritis, retinopatía y el síndrome de Sjögren.
5. Alteraciones pulmonares: Enfermedad pleural, fibrosis intersticial, enfermedad nodular pulmonar, la bronquiolitis y la arteritis con hipertensión pulmonar.
6. Alteraciones renales: Glomerulonefritis o amiloidosis.
7. Pinzamiento articular: Presión de un nervio u órgano por la reducción del espacio existente en una articulación y que puede observarse mediante estudio radiológico.
8. Anti cuerpos anti citrulina: Se registró la existencia de estos anticuerpos en plasma si se encontraron por encima del límite de detección de la técnica empleada en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (ELISA) para su determinación en al menos una ocasión.
9. Factor reumatoide: Si en al menos una ocasión el valor se situó por encima de 60 u/mL empleando la técnica de

análisis habitual usada en el servicio de Análisis clínicos del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Por otro lado el equipo de reumatología participante en el estudio evaluó la actividad de la enfermedad empleando el DAS28 que es índice más comúnmente utilizado y se obtiene mediante una fórmula compleja que valora la evaluación del dolor e inflamación en 28 articulaciones, la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la evaluación del estado general percibido por el paciente medido a través de una escala visual analógica (EVA)(4):

$$\text{DAS28 (4)} = 0,56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0,70 \ln(\text{VSG}) + 0,014 (\text{EVA})$$

El DAS28 se puntúa de 0 a 11, donde 0 significa ausencia de actividad y 11 máxima actividad y permite evaluar y comparar tratamientos. (Tabla 9):

Tabla 9. Clasificación de la actividad inflamatoria según el DAS28 extraída de la Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Artritis Reumatoide en España, 2007.

Remisión	<2,6
Actividad baja	2,6 < DAS28 <3,2
Actividad moderada	3,2 < DAS28 < 5,1
Actividad alta	≥ 5,1

3.2.3 Variables de respuesta al tratamiento.

En la actualidad los criterios más aceptados para evaluar la respuesta al tratamiento en la AR son los criterios de la European League Against Rheumatism (EULAR) y los criterios de American College of Rheumatology (ACR).

Los criterios de respuesta EULAR están basados en el cálculo de un índice de mejoría de la enfermedad. Este índice compuesto tiene la ventaja de ser reproducible en la práctica clínica habitual y se obtiene de medir la diferencia entre el valor del DAS28 al inicio y en el momento de la evaluación del tratamiento, y el valor absoluto de la puntuación final del DAS28. Según los criterios EULAR la respuesta al tratamiento puede ser clasificada como buena, moderada o no respuesta al tratamiento. Esta evaluación suele realizarse a los 3 meses del inicio del tratamiento y posteriormente se lleva a cabo un control cada 3 meses en caso de buen control de la patología o cada mes si el tratamiento vigente fracasa. La práctica clínica no se modificó durante el estudio.

Según criterios EULAR (113) se establecerán los diferentes tipos de respuesta como (ver resumen en tabla 10):

- I. Buen respondedor: DAS28 a los 3 o 6 meses $<3,2$ y $\Delta\text{DAS28}>1,2$.
- II. No respondedor: ΔDAS28 a los 3 o 6 meses $<0,6$ y/ o DAS28 al final del tratamiento de $>5,1$.
- III. Respondedor moderado: ΔDAS28 a los 3 o 6 meses entre 1,2 y 0,7. DAS28 final del tratamiento de entre 3,2 y 5,1.

Tabla 10. Evaluación de la respuesta al tratamiento según criterios EULAR (DAS28).

Actividad según DAS 28	DAS28 final tratamiento (valor absoluto)	Reducción DAS 28 desde el valor basal al tercer mes de inicio de tratamiento		
		$>1,2$	$>0,6$ y $\leq 1,2$	$\leq 0,6$
Remisión	$<2,6$	Buena Respuesta		
Actividad leve	$<3,2$			
Actividad moderada	$>3,2$ y $\leq 5,1$	Respuesta Moderada		
Actividad severa	$>5,1$	No Respuesta		

3.2.3 Variables de toxicidad al tratamiento.

En cuanto a las reacciones adversas se tipificaron como tal las siguientes en cuanto al tratamiento con Metotrexato:

Toxicidad hepática definida como el incremento de tres veces los valores normales de las enzimas hepáticas: Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanino aminotransferasa (ALT), en ausencia de una elevación previa de las enzimas, marcadores positivos de hepatitis viral o consumo de alcohol de forma crónica y/o aguda, alteraciones gastrointestinales (diarreas, mucositis), dermatológicas (rash), reacciones pulmonares (fibrosis) y hematológicas (neutropenia, trombocitopenia).

En el caso de los fármacos anti TNF se tipificaron como posibles reacciones adversas a los fármacos las siguientes:

Infecciones del tracto respiratorio alto, infecciones y dolor en el sitio de inyección, alteraciones hematológicas (neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, anemia aplásica), reacciones dermatológicas (rash) y dolor de cabeza.

3.2.4 Obtención de sangre periférica para el aislamiento de ADN y de neutrófilos.

Para la obtención de ADN y neutrófilos se extrajeron 9 ml de sangre por cada paciente reclutado diagnosticado de AR en el servicio de reumatología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y se repartieron en tubos plásticos Vacutainer™ de 3 ml.

Estos tubos contienen citrato, un anticoagulante reversible que en la clínica se usan para ensayos de coagulación.

Las muestras de sangre para la extracción de ADN de los pacientes se tomaron indistintamente antes, durante o después de haber terminado con alguno de los tratamientos de estudio, siempre y cuando hubieran superado el umbral de dos años en tratamiento y en seguimiento por el servicio de reumatología. Las muestras de sangre periférica para la extracción de ARN de neutrófilos periféricos se tomaron en el mismo momento.

Se trata de un estudio observacional y por tanto ni el tratamiento de los pacientes incluidos ni las pautas de actuación habituales llevadas a cabo por el servicio de reumatología se alteraron de ninguna forma.

3.2.5 Extracción de ADN genómico y genotipado.

El primer paso consistió en traspasar 1 ml de sangre de las muestras de un Vacutainer con citrato sódico a otro con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, ideal para la conservación de la sangre completa. De esta forma se pudo mantener a -20°C hasta que se procedió a la extracción del ADN.

- Extracción

Partiendo de 1 ml de sangre almacenado, tanto en controles como en pacientes, el ADN se extrajo utilizando el kit comercial QIAamp ADN Blood Mini Kit (Qiagen®, Madrid), mediante la tecnología QIAcube. Esta metodología consiste en una extracción-purificación automatizada en la que el ADN queda retenido en una membrana de sílice, mientras el resto de componentes son filtrados usando la fuerza centrífuga (Figura 24). Se realizó un paso previo manual de lisado de la sangre con proteinasa K y buffer de lisis (que contiene EDTA, NH₄Cl y NaCO₃), mezclando e incubando a 56°C. El buffer que el equipo añadió en el primer lavado contiene hidrocloreuro de guanidina y desnaturaliza las proteínas de la muestra. El segundo lavado se realizó con etanol al 70% para eliminar las sales y dejar el ADN totalmente purificado. Finalmente, el buffer de elución consiste en EDTA con tampón Tris clorado, a pH 9. El proceso se detalla paso a paso junto con una imagen ilustrativa en la figura 24:

Tabla 11. Proceso de extracción de ADN.

1.- En un tubo eppendorf colocar 20 ul de proteinasa K.
2.- Añadir 200 ul de la muestra.
3.- Añadir 200 ul del buffer de lisis AL (Qiagen).
4.- Digerir 10 min a 56 °C.
5.- Añadir 200 ul de etanol absoluto y vortesear.
6.- Pasar el contenido a una columna sin tocar el borde.
7.- Centrifugar 1 min a 8000 rpm.
8.- Eliminar el eluido y pasar la columna a otro tubo limpio.
9.- Añadir 500 ul del buffer AW1, y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
10.- Eliminar el eluido.
11.- Añadir 500 ul del buffer AW2, y centrifugar 3 min a 14000 rpm.
12.- Eliminar el eluido
13.- Pasar la columna a un tubo eppendorf limpio y añadir 200 ul de buffer AE.
14.- Dejar reposar unos 5 min y centrifugar 1 min a 8000 rpm.

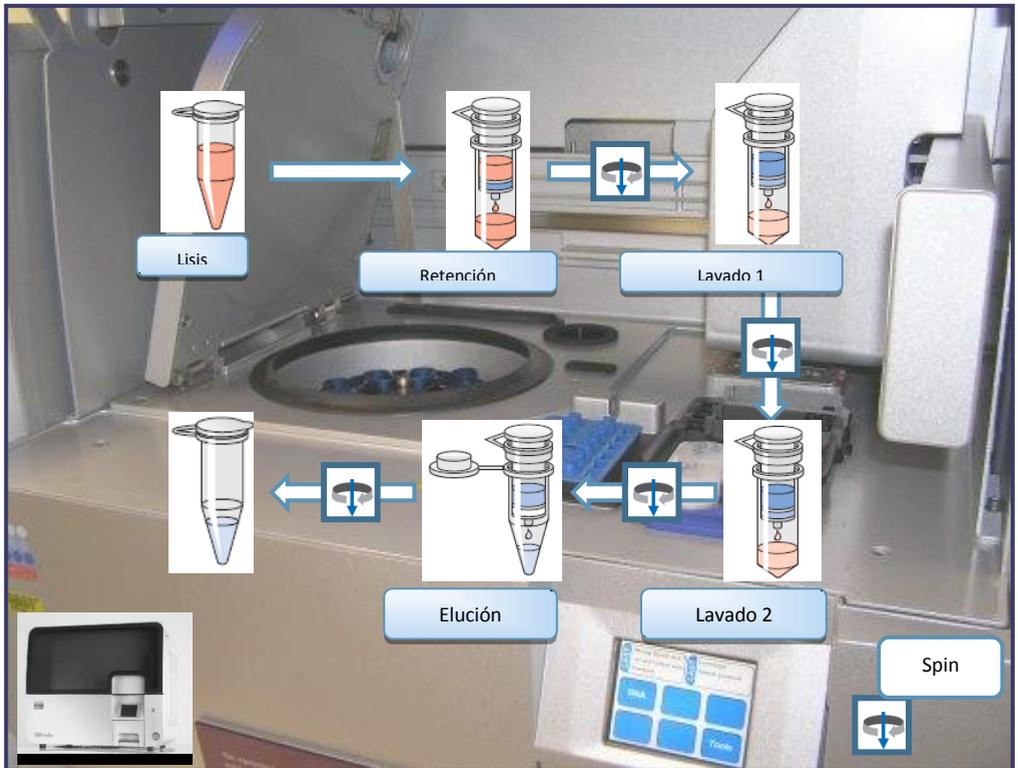


Figura 24. Purificación en QIAcube. El ADN queda retenido en una membrana de sílice y el resto de los componentes es eliminado por centrifugación y lavado.

- Cuantificación

A continuación se cuantificó la concentración de ADN de la muestra por absorbancia a 260/280nm mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo®) (Figura 25). Las bases nitrogenadas

absorben a 260 nm, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos hacen que las proteínas absorban a 280 nm. La relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) debe ser de entre 1,8 y 2 para considerar que el ADN se encuentra purificado en la muestra.



Figura 25. Espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 para la cuantificación de ácidos nucleicos.

- Genotipado: Discriminación alélica.

El genotipado de la muestra se realizó mediante el método de discriminación alélica con 10 ng de ADN por reacción. Esta técnica permite identificar polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)

empleando sondas TaqMan marcadas con los fluoróforos FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC (cuya estructura no ha sido publicada) en el extremo 5' correspondientes a los alelos de estudio. Más adelante en la tabla 14 se muestran las correspondencias alelo-fluoróforo.

En esta técnica se aprovecha la afinidad de las sondas marcadas por la muestra de ADN y se realiza una amplificación por PCR a tiempo real. Cuando la polimerasa llega a la zona donde se ha producido la unión de la sonda de interés con nuestro SNP se produce la escisión del fluoróforo en cuestión y es en ese momento cuando empieza a emitir fluorescencia. De esta manera se conoce qué polimorfismos están presentes en el gen de estudio según la longitud de onda a la que se produzca la emisión tal como se muestra en el esquema de la figura 26.

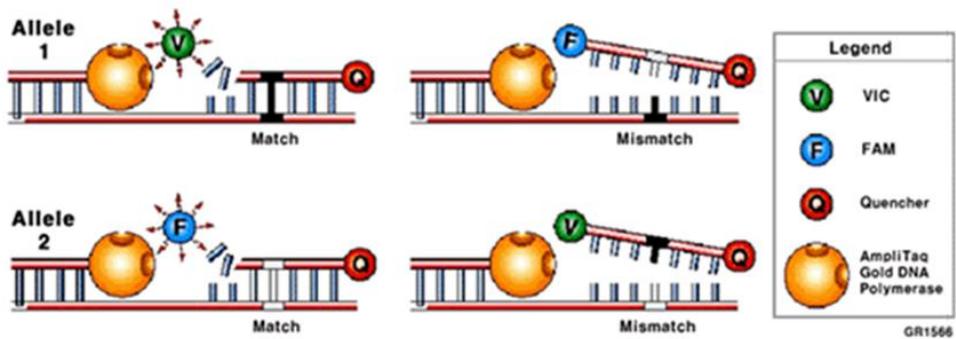


Figura 26. Esquema del proceso de genotipado por discriminación alélica. Según la sonda con el polimorfismo de estudio que se fije a la hebra de ADN molde empleada en la amplificación se producirá la emisión a una u otra longitud de onda.

Como polimerasa se utilizó TaqMan Genotyping Master Mix (*Applied biosystems*). En el proceso en primer lugar se preparó el mix de reacción para la PCR. Las reacciones de genotipado se llevaron a cabo en una placa de 384 pocillos, donde se transfirieron 2,75 µl de mix de reacción por pocillo.

Los mix de reacción en cada pocillo se componían de la siguiente mezcla (tabla 12):

Tabla 12. Composición del mix de reacción para PCR.

COMPONENTE	VOLUMEN (µl/reacción)
TaqMan Genotyping Master Mix	2,5
SNP Genotyping Assay Mix (20X)	0,25
Total	2,75

Posteriormente en cada pocillo se pipetearon 2,25 µl de la muestra de ADN. El volumen final por pocillo fue de 5 µl (mix de reacción+muestra ADN).

La reacción de discriminación alélica se llevó a cabo en un analizador 7900 HT real time PCR system de *Applied biosistem*. Las condiciones de temperatura y ciclos de reacción para la amplificación de ADN y discriminación alélica se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de temperatura y ciclos de reacción para llevar a cabo la reacción de discriminación alélica en el analizador 7900 HT RT PCR system.

PASO	TEMPERATURA	DURACIÓN	CICLOS
Activación de la ADN polimerasa (AmpliTaq Gold)	95°C	10 minutos	Inicial
Desnaturalización	92°C	15 segundos	40
Emparejamiento/Extensión	60°C	1 minuto	

Una vez acabada la reacción de PCR se analizaron los resultados en el plotter del software del analizador 7900 HT. Las longitudes de onda (λ) de emisión de FAM y VIC respectivamente son de 515 y 546nm, según el alelo presente en la muestra unirá una sonda u otra o en caso de individuos heterocigotos ambas, produciéndose fluorescencia a ambas longitudes de onda (Figura 27).

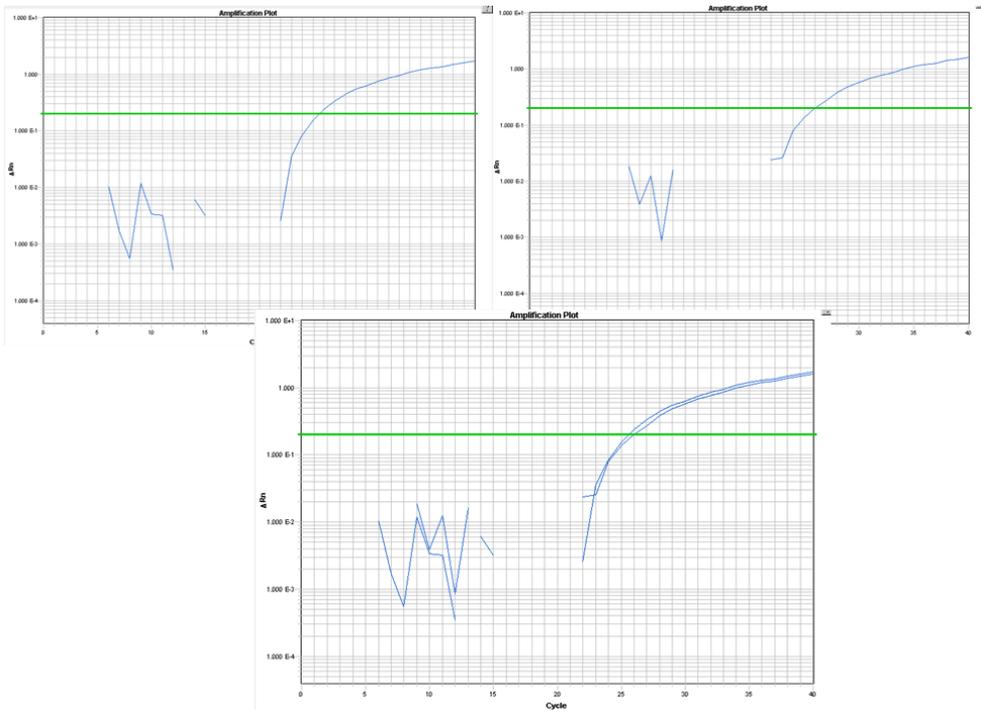


Figura 27. Ejemplo de genotipado por discriminación alélica de un heterocigoto. En las dos gráficas superiores fluorescencia/ciclos se representa la amplificación para el alelo marcado con FAM (izquierda) y con VIC (derecha), y sumando abajo las dos señales se aprecian dos curvas de amplificación.

Los polimorfismos seleccionados se recogen en la tabla 14 donde se muestran los alelos asociados y la correspondencia con los fluoróforos. Estos polimorfismos han sido seleccionados basándonos en la bibliografía disponible. Como ya se ha comentado el gen que codifica para la MTHFR presenta un papel fundamental por su importancia en la regeneración de folato reducido en la síntesis de metionina; individuos deficitarios en esta enzima pueden sufrir toxicidad por acumulación de homocisteína que puede verse agravada o puesta de manifiesto en presencia de MTX ya que inhibe esta enzima. Se han descrito dos polimorfismos que están relacionados con un aumento de toxicidad por MTX por generar enzimas deficitarias: MTHFR_rs1801133_C677T y MTHFR_rs1801131_A1298C (114).

En cuanto al SLCO1B1_rs11045879_C/T, éste fue seleccionado por codificar una proteína que forma parte de una superfamilia de transportadores de anión orgánico que juegan un papel importante en el transporte de MTX al interior del hepatocito necesario para que pueda llevarse a cabo el proceso metabólico. Concretamente este polimorfismo se ha asociado a un déficit en la actividad transportadora y por tanto a un exceso de fármaco en sangre, lo que conlleva mayor toxicidad gastrointestinal por acúmulo de fármaco (115).

En cuanto al TNF- α , se han seleccionado polimorfismos localizados en el gen que codifica la propia citoquina especialmente los polimorfismos localizados en la región promotora determinan la cantidad de TNF- α circulante y se han asociado en varios estudios con la susceptibilidad a la enfermedad. El primer polimorfismo identificado fue una transición entre guanina y adenina en la posición -308 (116, 117). Otro polimorfismo importante se localiza en la posición -238 de la región promotora (118) y el último se sitúa en la posición -875 y en ambos casos se han relacionado con la susceptibilidad a sufrir AR por influir en los niveles circulantes de TNF- α (119).

El polimorfismo incluido para la IL-10 (rs1800896 G-1082) se ha relacionado con el riesgo de sufrir la enfermedad (120). Por otro lado una citoquina con características similares sería IL-4. En su caso, se estudió el polimorfismo rs2070874 C33T, que según otros autores influye en la severidad de la AR (121).

En cuanto al receptor de TNF- α , TNF-R2, éste es codificado por el gen TNFRSF1B y se sabe que el SNP rs1061622 676T>G podría relacionarse con los niveles de TNF- α y con la severidad de la patología (101).

En el caso del receptor FcγRIIIA, el SNP rs396991 C/A, este SNP fue elegido por determinar la afinidad de unión a IgG y el grado de activación inducida por la misma variable (102). En el caso del FcγRIIA no se ha podido encontrar una buena relación entre ninguno de sus polimorfismos y la enfermedad, en el presente estudio se analizó el SNP rs1801274 A/G (His167Arg) que parece aumentar la unión a inmunocomplejos tales como los formados por FR y ACCPs (122).

El polimorfismo rs7574865 G/T del transductor de señal y activador de la transcripción número 4 (STAT4) se asocia con un incremento en el DAS28 de los pacientes de AR (123). Por otro lado el alelo T del PTPN22 rs2476601 C1858T está fuertemente asociado a la enfermedad (124).

En el estudio se incluyeron dos SNPs relacionados con la IL-6 (58). El SNP en su receptor soluble, IL-6 Rsol rs8192284 A358C se relaciona con formas más graves de la patología (125). Otro SNP estudiado (rs1800796 -572G>C) se encuentra en la región promotora del gen de la propia interleucina y se ha relacionado con niveles plasmáticos elevados de IL-6. Para este SNP no hay estudios validados que permitan, actualmente, asociarlo a la enfermedad.

Finalmente, el último gen seleccionado fue descubierto en el GWAS de 2011 llevado a cabo por el grupo de Plant: PDZD. Este gen influye en la secreción de insulina cuando la concentración de glucosa es baja, relacionándose la resistencia a insulina y la presencia de elevados niveles de la misma con un grado severo de la enfermedad.

Tabla 14. Correspondencia alelo-fluoróforo.

<i>MTHFR</i>	<i>C__1202883_20_MTHFR_rs1801133_C677T (vic/fam:G/A)</i>
<i>MTHFR</i>	<i>C__850486_20_MTHFR_rs1801131_A1298C (vic/fam:G/T)</i>
<i>SLCO1B1</i>	<i>C__31106904_10_SLCO1B1_rs11045879_C/T (vic/fam:C/T)</i>
<i>TNF - α</i>	<i>C__11918223_10_TNF-a_rs1799724_T-857C (vic/fam:C/T)</i>
<i>TNF - α</i>	<i>C__7514879_10_TNF-a_rs1800629_G-308A (vic/fam:A/G)</i>
<i>TNF - α</i>	<i>C__2215707_10_TNF-a_rs361525_G-238A (vic/fam:A/G)</i>
<i>IL -10</i>	<i>C__1747360_10_IL-10_rs1800896_G-1082A (vic/fam:T/C)</i>
<i>IL -4</i>	<i>C__16176215_10_IL4_rs2070874_C33T (vic/fam:C/T)</i>
<i>TNFSRF1b</i>	<i>C__8861232_20_TNFSF1b_rs1061622_676T>G (vic/fam:G/T)</i>
<i>FCGR3A</i>	<i>C__25815666_10_FCGR3A_rs396991_C559A(vic/fam:C/A)</i>
<i>FCGR2A</i>	<i>C__9077561_20_FCGR2A_rs1801274_G519A (vic/fam:G/A)</i>
<i>STAT4</i>	<i>C__29882391_10_STAT4_rs7574865_G/T (vic/fam:G/T)</i>
<i>PTPN22</i>	<i>C__16021387_20_PTPN22_rs2476601_C1858T (vic/fam:A/G)</i>
<i>IL -6 Rsol</i>	<i>C__16170664_10_IL-6_rs8192284_A358C (vic/fam:C/A)</i>
<i>IL -6</i>	<i>C__11326893_10_IL-6_rs1800796_572G>C (vic/fam:C/G)</i>
<i>PDZD2</i>	<i>C__2938634_10_PDZD2_rs1532269_C/G (vic/fam:C/G)</i>

3.2.6 Extracción neutrófilos y expresión de ARN en neutrófilos.

- Aislamiento de neutrófilos en sangre periférica.

A partir de 8 mililitros de sangre periférica se realizó la extracción de neutrófilos. Para ello se realizaron una serie de separaciones en base al tamaño y la densidad celular. En primer lugar, se mezcló la sangre con dextrano y por el incremento de viscosidad, después de 45 minutos de reposo los neutrófilos se quedaron en el sobrenadante con algunos granulocitos, pero la mayoría de estos últimos sedimentaron. El paso siguiente consistió en una centrifugación zonal con Ficoll, medio denso, a baja velocidad. En este caso, los neutrófilos quedaron en el sedimento (con una viabilidad mayor al 95% en tinción azul tripan), pero mezclados con algunos eritrocitos por lo que se añadieron 3 ml de buffer de lisis celular (cantidad para 100ml: Cloruro de amonio 0,83g, bicarbonato potásico 0,1g, EDTA 0.5M 0,2 ml) que los eliminó tras una incubación en hielo de 15 minutos y un spin a 1500 rpm.

- Extracción de ARN y determinación de expresión genética por PCR a tiempo real.

- Extracción de ARN

Se extrajo y purificó el ARN total siguiendo el procedimiento estándar con el sistema de extracción *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems®) (Figura 28) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El fundamento que emplea este equipo para la extracción de ARN es similar al QIAcube, pero en este caso el equipo procede directamente en placa de 96 pocillos (Figura 29) y como fuerza impulsora no usa la centrifugación, si no el vacío.

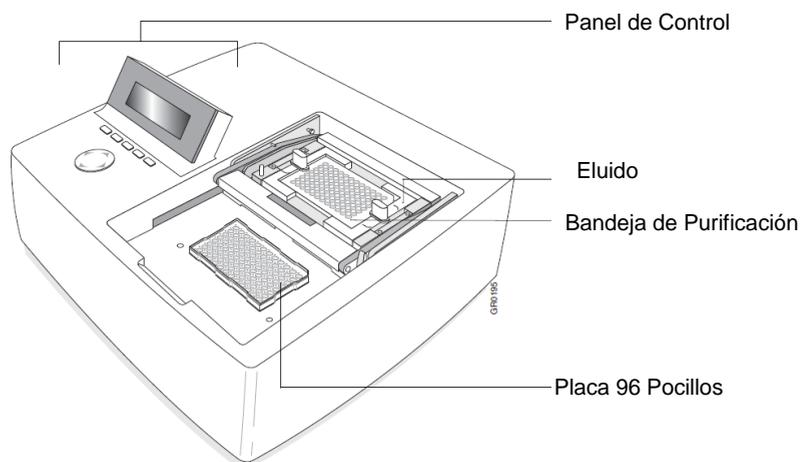


Figura 28. *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation.*

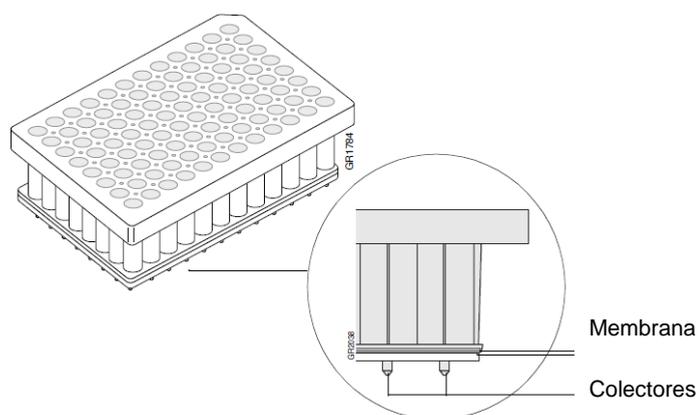


Figura 29. Placa empleada para la extracción de ARN con la estación ABI Prism™ 6100.

- Cuantificación de ARN

Se cuantificó el ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (Figura 30) (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total ($\text{ng}/\mu\text{L}$) mediante medidas de absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio A_{260}/A_{280} .



Figura 30. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station* para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* para la cuantificación de ácidos nucleicos.

La integridad del ARN extraído fue confirmada con el sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización.

- Retrotranscripción inversa (RT).

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) partir de un ARN molde.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc

utilizando el kit “*Taq Man para la retrotranscripción inversa*”. Se realizó este proceso en un *termociclador 9800 Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU*) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C (Figura 31). El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

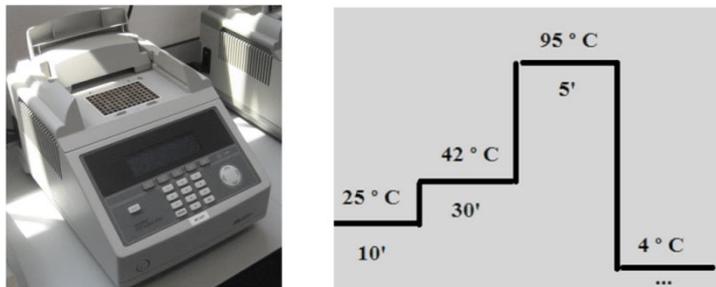


Figura 31. Retrotranscripción inversa. Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler para realizar la reacción de retrotranscripción inversa y etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas (°C) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

- RT-PCR a tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los

cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación se basa en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

- Desnaturalización del ADN molde.
- Hibridación de cebadores.
- Elongación.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés.

La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm) a partir de las copias de ADN obtenidas por retrotranscripción. Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la misma. Para ello se utilizaron *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®*, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos *TaqMan* utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la *Taq polimerasa* de ADN

para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura:

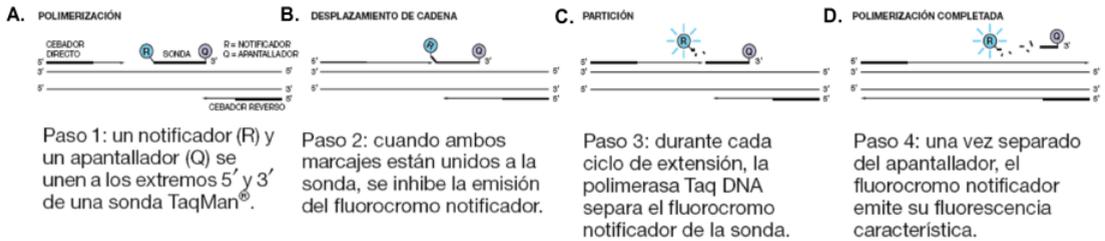


Figura 32. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a medida que se acumula durante la reacción (Figura extraída de “Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos” 2006, 2010).

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos.

Cada reacción de PCR consta de los siguientes componentes:

- 1,5 µL de ADNc sintetizado en la transcripción inversa.
- 5 µL de TaqMan® Gene Expression Master Mix.
- 0,5 µL de la sonda y cebadores correspondientes.

- 3 μL de agua dietilpirocarbonato (DEPC).

La PCR se desarrolla en un termociclador 7900HT *Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 50°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C (Figura 33).

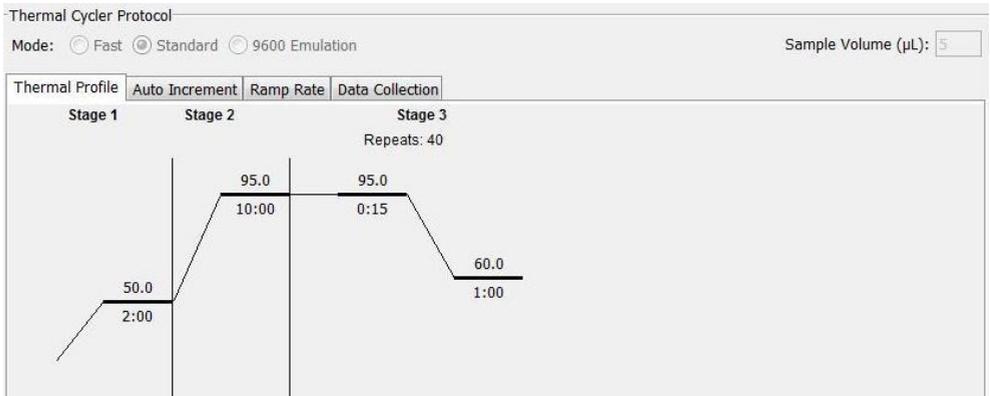


Figura 33. Programación RT-PCR.

Se utilizaron oligonucleótidos y sondas *TaqMan (Assay on Demand)* para los genes FCGR3A, FCGR2A, STAT3, JAK2, TNF- α , TGF β 1, IL-10 y MMP-9 (fluoróforo FAM). Estos genes se seleccionaron por su papel en la respuesta inmunitaria. Los FCGR3A

y 2A codifican receptores para la fracción constante de IgG y su concentración incrementada se relaciona con mayor activación de neutrófilos por unión de esta Ig. Se estudiaron también JAK2 y STAT3 que actúan como transductores de la señal de citoquinas hasta el propio núcleo activando la transcripción de genes concretos, destinados a favorecer aún más la respuesta inflamatoria. Por supuesto se analizó también la expresión de la citoquina central de todo el proceso, el TNF- α . La expresión del TGF- β (factor transformador de crecimiento- β) también se analizó. La expresión de IL-10 fue añadida al estudio por considerarse que podría actuar como reguladora de la actividad inflamatoria. En cuanto a la MMP-9, se estudió por su relación directa con el daño que causa en las estructuras proteicas de los tejidos que forman el cartílago.

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión se empleó también el gen GAPDH (gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa) como control interno ya que se transcribe activamente en todas las células, marcado en este caso con el fluoróforo VIC. Los niveles de expresión de ARN mensajero de estos genes son estimados mediante el método de cuantificación relativa (RQ) o incrementos de Ct (Ciclo Umbral o *Threshold Cycle*) respecto al gen control ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$).

El resultado de todo el proceso instrumental consiste en la representación gráfica de una curva de amplificación en la que se representan los 40 ciclos de reacción de amplificación en cadena frente a la fluorescencia detectada. En la curva obtenida se diferencian cuatro fases en función de la señal de fluorescencia, que le otorgan una forma sigmoidea. La primera fase se denomina basal y se caracteriza por la invariabilidad de la señal de fluorescencia en los primeros ciclos térmicos, en los que no se da amplificación. En la segunda fase de la curva se da una amplificación exponencial, en cada ciclo se duplica el producto amplificado, de modo que para N ciclos la amplificación podría estimarse como 2^N . La tercera fase es lineal, ya que comienza a limitarse la capacidad de amplificación dada la alta acumulación de productos amplificados y el desgaste de los reactivos. Por último, se da una fase de plateau en la que la reacción se satura y no se da amplificación de los productos.

El análisis de los datos se realiza por comparación del parámetro C_t , entre el producto a analizar y un control endógeno de normalización que debe mantener la expresión constante en todas las muestras. El C_t puede quedar definido como el ciclo a partir del cual se considera estadísticamente significativa la fluorescencia emitida con respecto al ruido de fondo o *background*. El C_t marca la

transición entre la fase basal y la exponencial y es inversamente proporcional al número de moléculas iniciales presentes en la reacción. Mediante la herramienta informática *SDS 2.4 de Applied Biosystem®*, software para el control del aparato y procesado de los resultados del *7900HT Fast Real-Time PCR System*, se establece el Ct de manera manual, situándolo en la fase exponencial de amplificación de todos los marcadores distintos cargados en una placa en el mismo análisis (Figura 34). Tras definir el Ct para todo el ensayo se realiza un análisis que determina los valores de expresión con su desviación típica.

Con los valores de expresión se realiza la cuantificación relativa ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$), siendo ΔCt la diferencia entre el valor de expresión de un gen de un individuo concreto (siendo este la media de los duplicados amplificados para ese individuo) con respecto al valor de expresión de GAPDH para ese individuo (que también se corresponde con un $N=2$); e $\Delta\Delta Ct$ la diferencia entre ΔCt y el promedio de ΔCt para los valores de ese gen en todos los individuos estudiados en este ensayo.

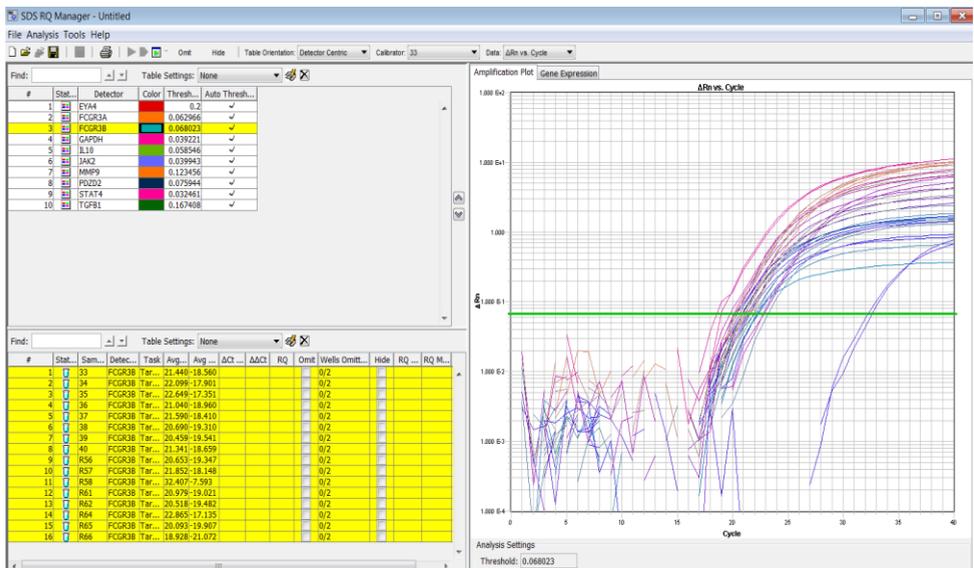


Figura 34. Gráfica Fluorescencia/Ciclos de amplificación. La línea horizontal de la gráfica paralela al eje abscisas (ciclos) representa el Ct.

3.3 Análisis estadístico.

En primer lugar se estudió la distribución de SNPs en todos los individuos analizados, validándola mediante equilibrio de Hardy-Weinberg con el paquete estadístico Haploview[®]. El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que en una población en la que no se produce selección natural y no se da ninguna mutación la herencia genética se mantiene en equilibrio; es un principio básico en la genética de poblaciones. Esto quiere decir que la herencia mendeliana

por sí misma no engendra cambio evolutivo y por tanto la herencia genética de los alelos que componen un gen puede predecirse aplicando una función matemática que tiene en cuenta la frecuencia alélica en ese locus en concreto. De no cumplir este equilibrio podría tratarse de mutaciones derivadas de factores externos, tal y como ocurre en las mutaciones de tipo somático observadas en los distintos tipos de cáncer.

En este estudio en concreto, el equilibrio podría verse ligeramente limitado por el tamaño de la población muestral, que se considera representativa de los ciudadanos que habitan en las proximidades regionales del Hospital General de Valencia de raza caucásica.

El estudio caso-control se contrastó con el paquete estadístico IBM SPSS 20[®], en concreto, mediante un estudio de contingencia de χ^2 (intervalo de confianza 95%), corrigiendo los valores de p mediante el método de Bonferroni, midiendo las frecuencias de cada alelo en pacientes y controles.

A continuación, antes de realizar estudios de hipótesis, se comprobó la distribución gaussiana para cada dato mediante análisis de histogramas y test de Kolmogorov-Smirnov, determinándose que los datos obtenidos no cumplían esta distribución, por lo que se

realizaron pruebas de hipótesis no paramétricas (test de Kruskal-Wallis cuando se analizaron más de dos grupos diferentes y test de U de Man-Whitney cuando fueron dos los grupos analizados).

También mediante el uso del SPSS 20[®], se estudió la relación entre el genotipo de los pacientes de artritis reumatoide y otras características que podrían asociarse con la enfermedad, así como la respuesta/toxicidad a los tratamientos, utilizándose pruebas de χ^2 y OR (odds ratio), así como correlaciones no paramétricas de ρ de Spearman.

Por último, los valores de expresión génica se investigaron como posible fuente de diferencias entre casos y controles mediante test χ^2 seguido de corrección mediante test de Bonferroni y en el caso de pacientes como posible relación con las características clínicas asociadas, así como la respuesta al tratamiento.

Los estudios de expresión se apoyaron con test de Mann-Whitney que no asumen distribución gaussiana y considera los pacientes independientes (two-tailed P-values). La herramienta informática que se utilizó fue GraphPad Prism[®].

4. Resultados:

4.1 Reclutamiento y características clínicas de los pacientes con artritis reumatoide y de los controles.

El número total de individuos reclutados en el presente estudio fue de 96 pacientes y 84 sujetos sanos en la parte de genotipado y de 44 sujetos sanos y 62 pacientes con AR en el subestudio de expresión génica en neutrófilos.

Se realizó un reclutamiento de pacientes con AR en tratamiento por parte del servicio de Reumatología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia durante el periodo de diciembre de 2010 a enero de 2014. Los sujetos controles fueron reclutados en el mismo periodo como voluntarios sanos, de la misma área geográfica, con características demográficas sin diferencias significativas respecto al grupo de artritis reumatoide (tabla 15).

Se recogieron datos demográficos y clínicos: el sexo, la edad, la presencia de anticuerpos anti-péptidos citrulinados, la presencia de factor reumatoide, el valor de DAS28, la presencia o no de pinzamiento articular, de nódulos reumatoideos y otras manifestaciones extra-articulares, erosiones, hábito tabáquico, duración de la enfermedad en años, toxicidad o no al metotrexato y anti-TNF- α y respuesta a metotrexato y a los anti-TNF- α .

Tabla 15. Comparación características clínicas y demográficas pacientes e individuos sanos.

DATOS CLÍNICOS	CONTROLES (n=84)	PACIENTES (n=96)	Valor de <i>P</i>
EDAD (AÑOS), media ± SD	49 ± 17	56 ± 15	0,59
SEXO FEMENINO n (%)	65 (77)	71 (75)	0,36
DAS28 media ± SD	0	2,38 ± 1,33	NA
DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD (AÑOS), media ± SD	0	8,9 ± 5,7	NA
FACTOR REUMATOIDE POSITIVO, n (%)	0	72 (78)	NA
ACCP POSITIVO, n (%)	0	72 (64)	NA
FUMADORES (%)	22 (26)	27 (28)	0,542
EROSIONES (%)	0	48 (52)	NA
MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES (%)	0	2 (3)	NA
NÓDULOS REUMATOIDEOS (%)	0	10 (11)	NA
PINZAMIENTO ARTICULAR (%)	0	58 (63)	NA

NA: no aplica (los individuos sanos no presentan ningún tipo de manifestación inflamatoria)

En la tabla 15 se muestran las características demográficas y clínicas comparadas entre el grupo de pacientes y el grupo control. Se observó que las características demográficas no mostraban diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) mientras que las características clínicas propias de la enfermedad estaban ausentes en

los sujetos control, los cuales se encontraban libres de episodios inflamatorios sistémicos.

En cuanto a las características clínicas individuales de los pacientes con artritis reumatoide incluidos en el estudio, éstas quedan reflejadas en la siguiente tabla (tabla 16):

Tabla 16. Datos clínicos individuales de los pacientes diagnosticados de artritis reumatoide.

	SEXO (V/M)	EDAD (26-50, 51-75, 76-100)	AC citrulinado	Factor reumatoideo	DAS28 numérico	Das28 gradual (<3=1; 3-5,1=2; >5,1=3)	Pinzamiento articular	Nódulos reumatoideos	Manifestaciones Extra-articulares	Erosiones articulares	Fumador	Duración enfermedad (Años)	Toxicidad a MTX	Respuesta anti-TNF- α	Respuesta a MTX
P01	M	3	SI	SI	2,82	1	NO	NO	NO	SI	NO	12			
P02	M	2	NO	SI	2,00	1	SI	NO	NO	SI	NO	11	SI		NO
P03	M	2	SI	SI	3,56	2	SI	NO	NO	SI	NO	7	NO		SI
P04	M	2	NO	NO	3,26	2	SI	NO	NO	SI	NO	14			
P05	M	3	NO	SI	3,34	2	SI	NO	NO	SI	NO	12	NO		SI
P06	V	2	SI	SI	1,88	1	SI	NO	NO	SI	NO	17			
P07	M	2	SI	SI	1,90	1	NO	NO	NO	NO	SI	4	NO		SI
P08	M	2	SI	SI	3,11	2	SI	SI	NO	SI	NO	14	NO	SI	NO
P09	V	1	SI	SI	0,50	1	NO	NO	NO	NO	NO	3	NO		NO
P10	M	2	NO	SI	2,09	1	SI	NO	NO	NO	NO	18	SI	SI	NO
P11	M	2	SI	SI	2,69	1	SI	NO	NO	NO	NO	8	NO		SI
P12	V	2	SI	SI	1,99	1	SI	NO	NO	NO	NO	13	NO		NO
P13	M	2	NO	SI	2,73	1	SI	NO	NO	SI	NO	13	NO		SI
P14	M	2	SI	SI	4,16	2	SI	SI	NO	SI	NO	31	NO		SI
P15	M	3	SI	SI	2,70	1	SI	NO	NO	SI	NO		NO		SI
P16	M	2	SI	SI	3,59	2	SI	NO	NO	SI	NO		NO	NO	NO
P17	V	2	NO	SI	1,20	1	NO	NO	NO	NO	SI	8	SI		SI
P18	V	2	NO	SI	1,48	1	SI	NO	NO	NO	NO	17	NO		SI
P19	V	2	NO	SI	3,36	2	SI	SI	NO	SI	NO	17	NO		SI
P20	M	2	NO	SI	2,38	1	SI	NO	NO	SI	NO	18	NO		SI
P21	M	2	NO	SI	1,75	1	NO	NO	NO	SI	NO	24	NO		SI
P22	M	2	NO	SI	2,80	1	SI	NO	NO	SI	NO		SI		SI
P23	M	2	NO	NO	1,50	1	SI	NO	NO	NO	NO	20	NO		SI
P24	M	2	SI	SI	1,53	1	SI	NO	SI	SI	SI	6	NO	SI	NO
P25	M	2	NO	SI	1,94	1	SI	NO	NO	NO	NO		NO		SI
P26	M	1	SI	SI	7,17	3	NO	NO	NO	NO	NO	2	NO		SI
P27	M	2	SI	SI	2,12	1	SI	NO	NO	SI	NO	12	NO		SI
P28															

	SEXO (V/M)	EDAD (26-50, 51-75, 76-100)	AC citrulinado	Factor reumatoideo	DAS28 numérico	Das28 gradual (<3=1; 3-5,1=2; >5,1=3)	Pinzamiento articular	Nódulos reumatoideos	Manifestaciones Extra-articulares	Erosiones articulares	Fumador	Duración enfermedad (Años)	Toxicidad a MTX	Respuesta anti-TNF- α	Respuesta a MTX
P29	V	1	NO	NO	1,00	1	SI	NO	NO	SI	NO	10	SI	SI	SI
P30	M	2	NO	NO	1,53	1	NO	NO	NO	NO	NO	10	NO		SI
P31	M	2	SI	SI	1,53	1	SI	NO	NO	NO	NO	13	NO	NO	NO
P32	V	2	SI	SI	3,17	2	SI	NO	NO	SI	NO	7	SI	SI	NO
P33	M	2	NO	SI	1,19	1	SI	NO	NO	NO	NO	15	NO	NO	NO
P34	M	2													
P35	M	2	NO	SI	1,50	1	SI	NO	NO	SI	SI	16	NO	NO	NO
P36	M	1	SI	SI	5,34	3	SI	NO	NO	SI	NO	16	NO	SI	SI
P37	M	2	NO	NO	4,61	2	NO	NO	NO	NO	SI	4	NO	SI	NO
P38	M	1	NO	SI	1,19	1	SI	SI	NO	SI	NO	12	NO	NO	NO
P39	V	1	SI	SI	2,24	1	SI	NO	NO	SI	SI	7	NO		SI
P40	M	2	SI	SI	3,49	2	SI	NO	NO	SI	SI	2	NO		SI
P41	M	1	NO	NO	4,60	2	NO	NO	NO	NO	NO	5	NO		SI
P42	M	1	SI	SI	3,19	2	NO	NO	NO	NO	NO	3	NO		SI
P43	M	2	SI	SI	3,14	2	SI	SI	NO	SI	SI	9	NO		SI
P44	M	2	SI	SI	5,37	3	SI	NO	NO	SI	NO	7	NO		SI
P45	V	2	SI	SI	1,30	1	SI	NO	NO	SI	NO	4	NO		NO
P46	V	2	SI	NO	1,89	1	SI	NO	NO	SI	NO	23			
P47	M	1	SI	NO	2,66	1	NO	NO	NO	NO	SI	3	NO		SI
P48	V	2	SI	SI	3,40	2	SI	NO	NO	NO	NO	2			
P49	M	1	SI	SI	2,37	1	NO	NO	NO	NO	NO	2			
P50	M	2	NO	NO	1,57	1	SI	NO	NO	NO	NO	11	NO	NO	NO
P51	M	2	SI	SI	2,91	1	NO	NO	NO	NO	SI	3	NO		SI
P52	M	2	SI	SI	4,33	2	NO	NO	NO	NO	NO	6			
P53	M	2	NO	NO	4,66	2	SI	NO	NO	NO	SI	5	SI		NO
P54	V	1	SI	SI	5,24	3	SI	NO	NO	SI	SI	12	NO		SI
P55	M	2	SI	SI	2,05	1	SI	NO	NO	SI	NO	8	SI		
P56	M	2	NO	NO	3,42	2	SI	NO	NO	SI	SI	7	NO	NO	NO
P57	M	1	NO	NO	4,22	2	NO	NO		SI	SI	4	NO		SI
P58	V	2	SI	SI	5,33	3	SI	NO	NO	SI	SI	8	NO		SI
P59	M	1	SI	SI	1,40	1	SI	NO	NO	NO	SI	3	SI		
P60	M	1	SI	SI	2,44	1	SI	NO		SI	NO	3	NO		SI
P61	M	2	SI	28	1,74	1	SI	SI	SI	SI	NO	21	NO	NO	NO
P62	M	2	NO	SI	2,64	1	NO	NO	NO	NO	NO	8	SI		NO
P63	M	1	SI	SI	4,09	2	NO	NO	NO	NO	NO	13	SI	NO	NO

	SEXO (V/M)	EDAD (26-50, 51-75, 76-100)	AC citrulinado	Factor reumatoideo	DAS28 numérico	Das28 gradual (<3=1; 3-5,1=2; >5,1=3)	Pinzamiento articular	Nódulos reumatoideos	Manifestaciones Extra-articulares	Erosiones articulares	Fumador	Duración enfermedad (Años)	Toxicidad a MTX	Respuesta anti-TNF- α	Respuesta a MTX
P64	M	3	NO	NO	4,09	2	NO	NO	NO	NO	NO	3	NO	SI	SI
P65	M	2	SI	SI	2,37	1	SI	NO	NO	SI	NO	21	SI	NO	NO
P66	V	1	SI	SI	1,60	1	SI	SI	NO	SI	SI	22	NO		NO
P67	M	1	SI	SI	2,12	1		NO	NO		SI	6	NO		NO
P68	M	1	NO	NO	1,95	1	SI	NO	NO	SI	SI	7	NO	NO	NO
P69	M	1	SI	SI	4,60	2	NO	NO	NO	NO	NO	19	SI	SI	NO
P70	M	3	NO	SI	2,10	1	SI	SI	NO	SI	NO	16	NO	NO	SI
P71															
P72	M	2	NO	NO	1,50	1	NO	NO	NO	SI	NO	11	SI		NO
P73	M	1	SI	SI	3,50	2	NO	NO	NO	NO	NO	6	NO		SI
P74	V	1	SI	SI	1,96	1	NO	NO	NO	NO	SI	8		SI	
P75	V	3	SI	SI	2,59	1	NO	NO	NO	NO	NO	7	NO		SI
P76	M	3	SI	SI	4,80	2					NO		NO	SI	NO
P77	M	2	SI	SI	1,60	1	SI	NO	NO	NO	NO	18		NO	
P78	V	2	SI	SI	2,00	1	NO	NO	NO	NO	NO	6	NO		SI
P79	V	2	SI	SI	1,60	1	NO	NO	NO	NO	NO	14			
P80	M	2	SI	SI	4,07	2	SI	NO	NO	SI	SI	9	NO		SI
P81	V	2	SI	SI	1,27	1	SI	NO	NO	NO	NO	3	NO		SI
P82	M	2	SI	SI	1,30	1	SI	NO	NO	SI	NO	9	NO	SI	NO
P83	M	2	SI	SI	5,43	3	SI	NO	NO	SI	SI	3	NO		NO
P84	M	3	SI	SI	1,60	1	SI	SI	NO	NO	NO	3	NO		SI
P85	M	1	NO	NO	1,80	1	NO	NO	NO	NO	NO	16	NO	NO	NO
P86	M	3	NO	SI	1,60	1	NO	NO	NO	NO	NO	13			
P87	M	2	SI	SI	1,10	1	NO	NO	NO	NO	NO	7	NO		SI
P88	M	2	SI	SI	0,90	1	NO	NO	NO	NO	NO	10	NO		SI
P89	M	2	NO	NO	1,60	1	NO	NO	NO	NO	NO	11	NO	NO	NO
P90	M	1	SI	SI	5,08	3	NO	NO	NO	NO	NO	9	NO		SI
P91	M	1	SI	NO	3,64	2	SI	NO	NO	SI	SI	5	NO		SI
P92	V	2	SI	SI	3,85	2	SI	SI	NO	SI	SI	9	NO	NO	NO
P93	V	1	SI	SI	2,86	1	NO	NO	NO	NO	SI	2	NO		SI
P94	V	2	SI	SI	1,20	1	NO	NO	NO	NO	NO	12	NO		NO
P95	M	2	SI	NO	4,05	2	SI	NO	NO	SI	SI	2	NO		NO
P96	M	2	SI	SI	4,5	2	SI	NO	NO	SI	SI	3	NO		NO

Nota: Los espacios en blanco de la tabla indican que estos datos no se encontraban recogidos en la historia clínica o bien se trata de pacientes no tratados con los fármacos de estudio. Para los análisis estadísticos se han tenido en cuenta como “missing values”.

4.2 Estudio de genotipado casos-contrroles.

4.2.1 Análisis de distribuciones de SNPs en casos y contrroles: comparación con el estudio HapMap.

El primer estudio llevado a cabo trató de encontrar marcadores genéticos relacionados con la enfermedad; para ello se genotiparon un total de 96 pacientes con artritis reumatoide y 84 individuos sanos. Se analizaron polimorfismos en los genes MTHFR, SLCO1B1, TNF- α , TNFSF1 β , IL-10, IL-4, FCGR3A, FCGR2A, STAT4, PTPN22, IL-6 y su receptor soluble (IL-6 Rsol) y PDZD2.

En primer lugar se procedió a la comparación de las frecuencias genotípicas de los alelos estudiados entre los individuos de estudio y los resultados publicados del estudio HapMap para de esta manera comprobar que nuestra población es similar a la población general. El proyecto HapMap es un proyecto internacional creado para desarrollar un mapa de haplotipos del genoma humano, en el que poder catalogar las regiones de similitudes y diferencias genéticas entre individuos que permita entender mejor la relación entre el

genoma y la salud humana. En la tabla 17 se muestra la comparación entre las frecuencias genotípicas obtenidas en este estudio y las registradas en estudios HapMap sobre poblaciones europeas donde predominan los individuos caucásicos.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas del estudio y comparación con las de estudios HapMap.

	<i>MTHFR</i> rs1801133 (C677T)	<i>MTHFR</i> rs1801131 (A1298C)	<i>SLCO1B1</i> rs11045879 C/T	<i>TNF-α</i> rs1799724 T-857C	<i>TNF-α</i> rs1800629 G-308A	<i>TNF-α</i> rs361525 G-238A	<i>IL-10</i> rs1800896 G-1082A	<i>IL-4</i> rs2070874 C33T
Controles	CC 0,370 CT 0,580 TT 0,050	AA 0,350 AC 0,580 CC 0,070	CC 0,010 CT 0,380 TT 0,610	CC 0,820 CT 0,180 TT 0,000	AA 0,020 AG 0,192 GG 0,778	AA 0,010 AG 0,310 GG 0,680	AA 0,330 AG 0,520 GG 0,140	CC 0,750 CT 0,210 TT 0,040
Pacientes	CC 0,316 CT 0,547 TT 0,136	AA 0,515 AC 0,410 CC 0,074	CC 0,031 CT 0,274 TT 0,695	CC 0,779 CT 0,190 TT 0,031	AA 0,010 AG 0,136 GG 0,853	AA 0,010 AG 0,159 GG 0,830	AA 0,400 AG 0,442 GG 0,158	CC 0,681 CT 0,266 TT 0,053
Suma	CC 0,343 CT 0,564 TT 0,093	AA 0,432 AC 0,495 CC 0,071	CC 0,021 CT 0,327 TT 0,652	CC 0,799 CT 0,185 TT 0,016	AA 0,015 AG 0,165 GG 0,815	AA 0,010 AG 0,235 GG 0,754	AA 0,365 AG 0,481 GG 0,149	CC 0,715 CT 0,237 TT 0,046
HapMap-CEU	CC 0,470 CT 0,440 TT 0,090	AA 0,420 AC 0,450 CC 0,130	CC 0,010 CT 0,310 TT 0,680	CC 0,900 CT 0,070 TT 0,030	AA 0,020 AG 0,310 GG 0,670	AA 0,001 AG 0,147 GG 0,853	AA 0,210 AG 0,510 GG 0,270	CC 0,740 CT 0,240 TT 0,020
	<i>TNFSF1b</i> rs1061622 676T>G	<i>FCGR3A</i> rs396991 C/A	<i>FCGR2A</i> rs1801274 G/A	<i>STAT4</i> rs7574865 G/T	<i>PTPN22</i> rs2476601 C1858T	<i>IL -6</i> Rsol rs8192284 A358C	<i>IL -6</i> rs1800796 -572G>C	<i>PDZD2</i> rs1532269 G/C
Controles	GG 0,000 GT 0,354 TT 0,646	AA 0,474 AC 0,442 CC 0,084	AA 0,260 AG 0,480 GG 0,260	GG 0,515 GT 0,424 TT 0,061	CC 0,905 CT 0,105 TT 0,000	AA 0,340 AC 0,447 CC 0,213	CC 0,010 CG 0,180 GG 0,810	CC 0,082 CG 0,245 GG 0,663
Pacientes	GG 0,053 GT 0,242 TT 0,705	AA 0,337 AC 0,465 CC 0,198	AA 0,169 AG 0,610 GG 0,221	GG 0,547 GT 0,379 TT 0,074	CC 0,779 CT 0,210 TT 0,010	AA 0,421 AC 0,463 CC 0,116	CC 0,021 CG 0,126 GG 0,853	CC 0,136 CG 0,231 GG 0,631
Suma	GG 0,035 GT 0,279 TT 0,686	AA 0,410 AC 0,453 CC 0,137	AA 0,214 AG 0,545 GG 0,240	GG 0,531 GT 0,402 TT 0,067	CC 0,840 CT 0,159 TT 0,005	AA 0,381 AC 0,455 CC 0,163	CC 0,015 CG 0,154 GG 0,831	CC 0,110 CG 0,239 GG 0,648
HapMap-CEU	GG 0,03 GT 0,43 TT 0,55	AA 0,467 AC 0,419 CC 0,115	AA 0,27 AG 0,45 GG 0,24	GG 0,6 GT 0,34 TT 0,06	CC 0,78 CT 0,22 TT 0,01	AA 0,42 AC 0,47 CC 0,12	CC 0 CG 0,09 GG 0,91	CC 0,08 CG 0,44 GG 0,48

No se observaron diferencias significativas entre las distribuciones genotípicas observadas en nuestra población frente a las detectadas en el estudio HapMap CEU, lo cual valida la determinación genotípica realizada en este trabajo de tesis doctoral.

4.2.2 Análisis de distribuciones de SNPs: equilibrio de Hardy-Weinberg.

Con el programa informático Haploview se determinó si la población para cada SNP se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, que como ya se ha comentado determina que la herencia genética se produce sin que existan influencias externas ni mutaciones somáticas. En la tabla 18 se representan los SNPs que cumplen con el equilibrio. Los valores p para los cuales se considera que el equilibrio de Hardy-Weinberg no se cumple, son aquellos inferiores a 0,001.

Tabla 18. Estudio de genotipado. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Gen	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Predicha	Hardy-Weinberg Valor de p	Frecuencia del alelo menor	Alelos
<i>MTHFR</i> C677T	0.564	0.47	0.0116	0.377	C:T
<i>MTHFR</i> A1298C	0.503	0.438	0.073	0.324	A:C
<i>SLCO1B1</i> C>T	0.324	0.301	0.461	0.184	T:C
<i>TNF-α</i> T-875C	0.184	0.194	0.6879	0.109	C:T
<i>TNF-α</i> G-308A	0.157	0.182	0.1666	0.101	G:A
<i>TNF-α</i> G-238A	0.229	0.22	0.9046	0.126	G:A
<i>IL-10</i> G-1082A	0.48	0.476	1.0	0.391	A:G
<i>IL-4</i> C33T	0.24	0.283	0.0832	0.17	C:T
<i>TNFSF1b</i> T676G	0.274	0.288	0.7417	0.174	T:G
<i>FCGR3A</i> C559A	0.455	0.46	0.9807	0.359	A:C
<i>FCGR2A</i> G519A	0.547	0.5	0.2728	0.486	G:A
<i>STAT4</i> G>T	0.399	0.391	0.9876	0.267	G:T
<i>PTPN22</i> C1858T	0.16	0.157	1.0	0.086	C:T
<i>IL-6Rso</i> A358C	0.454	0.475	0.6452	0.388	A:C
<i>IL-6</i> G572C	0.145	0.163	0.2972	0.089	G:C
<i>PDZD2</i> _G>C	0.237	0.356	0.0455	0.232	C:G

Tal como se muestra en la tabla en nuestro caso ninguno de los polimorfismos estudiados se encontró fuera del equilibrio y por tanto, se puede afirmar que la herencia de estas características genéticas se produce en nuestra población de acuerdo a leyes mendelianas.

Después de haber validado el equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizó un nuevo paso en busca de diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles.

4.2.3 Estudio de asociación genotípica: estudio casos-contróles de polimorfismos genéticos.

Para poder estimar la existencia de diferencias a nivel de genotipo entre individuos sanos y enfermos, también con la herramienta Haploview, se realizó un estudio de asociación mediante un test de hipótesis χ^2 obteniéndose los resultados reflejados en la tabla 19:

Tabla 19. Estudio de Asociación Caso-Control.

Gen	Alelo Asociado	Frecuencias Caso-Control	χ^2	Valor P
<i>MTHFR</i> C677T	T	0,411 - 0,339	1,926	0,165
<i>MTHFR</i> A1298C	A	0,721 - 0,625	4,526	0,0461
<i>SLCO1B1</i> C>T	T	0,832 - 0,798	0,684	0,4083
<i>TNF-α</i> T-875C	T	0,126 - 0,089	1,260	0,2617
<i>TNF-α</i> G-308A	G	0,921 - 0,873	2,205	0,1376
<i>TNF-α</i> G-238A	G	0,911 - 0,833	4,834	0,0279
<i>IL-10</i> G-1082A	G	0,621 - 0,595	0,250	0,6174
<i>IL-4</i> C33T	T	0,195 - 0,143	1,698	0,1926
<i>TNFSF1b</i> T676G	T	0,826 - 0,825	0,001	0,9792
<i>FCGR3A</i> C559A	A	0,569-0,695	5,586	0,0181
<i>FCGR2A</i> A519G	G	0,526 - 0,500	0,247	0,6191
<i>STAT4</i> G>T	G	0,737 - 0,729	0,028	0,8661
<i>PTPN22</i> C1858T	T	0,116 - 0,050	4,797	0,0285
<i>IL-6Rsol</i> A358C	A	0,653 - 0,563	2,900	0,0886
<i>IL-6</i> G572C	G	0,916 - 0,905	0,133	0,7151
<i>PDZD2</i> G>C	G	0,253 - 0,207	1,016	0,3136

Los SNPs que presentan significatividad estadística en las diferencias de distribución de genotipos entre casos y controles son los que presentan un valor de P menor a 0,05. De este modo se encontraron cuatro SNPs con variantes alélicas más representadas en pacientes que en individuos sanos: MTHFR A1298C, TNF- α G-238A, FCGR3A C559A y PTPN22 C1858T.

Entre los SNPs estudiados los dos primeros no presentan una relación directa con el desarrollo de la enfermedad, pero sí que son relevantes en el tratamiento de la misma. El gen MTHFR codifica para la metileno tetrahidrofolato reductasa, enzima que favorece la conversión de homocisteína a metionina durante la síntesis de proteínas.

La citoquina TNF- α se seleccionó para el estudio por su importante papel en el desarrollo de la enfermedad ya que se trata de una de las citoquinas pro-inflamatorias más relevantes, si no la central, e interviene directamente en el daño articular. En estudios recientes se han encontrado diversos SNPs, especialmente en la región promotora de TNF- α , que no han podido validarse como marcadores pero se asocian con una influencia directa sobre la enfermedad (97).

En el caso del receptor Fc γ RIIIA y el Fc γ RIIA los SNPs estudiados fueron elegidos por determinar la afinidad de los receptores

de IgG a la fracción constante de las inmunoglobulinas así como el grado de activación de los receptores de inmunoglobulinas.

El SNP del PTPN22 rs2476601 C1858T está fuertemente asociado a la enfermedad y parece condicionar la activación de linfocitos T.

Estos resultados fueron contrastados y ampliados mediante un estudio de contingencia de χ^2 (nivel de confianza 95%). En este estudio se miden las frecuencias de cada alelo en pacientes y controles junto con los valores de odds ratio (OR) (Tabla 20).

Tabla 20. Alelos asociados con la enfermedad.

Gen/ SNP	OR (95% CI)	OR (95% CI)	χ^2	Valor de P
<i>MTHFR_A1298C</i>	Alelo C: 0,683 (0,486-0,958)	Alelo A: 1,379 (1,050-1,813)	4,52	0,0461
<i>TNFα_G-238A</i>	Alelo A: 0,644 (0,426-0,974)	Alelo G: 1,487 (1,098-2,014)	4,83	0,0279
<i>FCGR3A_C559A</i>	Alelo A: 0,629 (0,433-0,913)	Alelo C: 1,650 (1,194-2,913)	5,58	0,0181
<i>PTPN22_C1858T</i>	Alelo C: 0,7 (0,531-0,922)	Alelo T: 1,78 (1,169-3,297)	4,79	0,0285

En este estudio se confirma que, en nuestra población, existen cuatro SNPs con mayor representación en individuos enfermos que en individuos sanos:

En el gen MTHFR el alelo A del polimorfismo A1298C se encuentra en nuestra población más representado en individuos enfermos que en sanos (OR 1,379 (1,050-1,813) P= 0,0461).

En cuanto al $TNF\alpha$, el polimorfismo localizado en la posición -238 de la región promotora ($TNF-\alpha$ G-238A) ha mostrado distinta distribución entre individuos enfermos y sanos, concretamente el alelo G está más presente en individuos enfermos y por tanto podría constituir un factor de riesgo (OR 1,487 (1,098-2,014) $P=0,0279$).

Por otro lado, en el polimorfismo FCGR3A_C>A se observa que el alelo C es más frecuente en individuos enfermos en nuestra población (OR 1,650 (0,994-2,913)).

Por último el alelo T del PTPN22_C1858T se encuentra asociado a la enfermedad en nuestra población de estudio (OR 1,78 (0,969-3,297) $P=0,0285$).

Dado que se trata de una enfermedad de influencia poligénica, como es el caso de la mayoría de enfermedades autoinmunes, se considera de interés conocer las combinaciones genéticas más frecuentes (haplotipos) que se dan entre los genes que influyen en la patología; es decir, es de interés conocer si estos genes se heredan conjuntamente y por tanto constituyen un factor de riesgo con mayor fuerza estadística. Teniendo en cuenta este interés, con la herramienta Haploview se realizó un estudio de asociación por combinación con los marcadores estudiados. De todas las posibles combinaciones se

obtuvieron 4 con diferencias estadísticamente significativas en su presencia en individuos enfermos y sanos:

- La presencia del haplotipo ACC en los polimorfismos TNF α G-238A, FCGR3A C>A y PTPN22 C1858T parece tener un papel protector con una frecuencia en controles del 8% frente al 2% en pacientes con AR (p=0,0055), tal y como se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Frecuencias haplotípicas TNF α G-238A, FCGR3A C>A y PTPN22 C1858T.

Haplotipo (TNF α G-238A_FCGR3A C>A_PTPN22 C1858T)	Frecuencia del haplotipo	Frecuencias Caso-Control	χ^2	Valor de P
GAC	0,523	0,565- 0,476	2,8040	0,0940
GCC	0,276	0,245- 0,312	2,0340	0,1538
AAC	0,062	0,053- 0,073	0,5820	0,4456
ACC	0,053	0,022- 0,088	7,6940	0,0055
GAT	0,045	0,063- 0,024	3,1430	0,0763
GCT	0,03	0,039- 0,021	0,9200	0,3376
AAT	0,011	0,014- 0,006	0,5400	0,4624

- Por otro lado el haplotipo AA de los SNPs MTHFR_A1298C y FCGR3A C>A parece estar relacionado con mayor susceptibilidad a la enfermedad con una frecuencia en pacientes del 49% frente al 38% en individuos sanos (p=0,027),

mientras que el CC constituiría un factor de protección para la misma, con una frecuencia del 17% en controles frente al 8% en pacientes ($p=0,008$), tal y como se muestra en la tabla 22.

Tabla 22. Frecuencias haplotípicas MTHFR_A1298C _ FCGR3A C>A.

Haplotipo (MTHFR_A1298C _ FCGR3A C>A)	Frecuencia del haplotipo	Frecuencias Caso-Control	χ^2	Valor de P
AA	0,445	0,499- 0,383	4,915	0,027
AC	0,231	0,222- 0,242	0,213	0,644
CA	0,196	0,195- 0,197	0,002	0,966
CC	0,128	0,084- 0,178	7,097	0,008

- En cuanto al haplotipo AG de los SNPs MTHFR_A1298C y TNFa G-238A, éste parece estar relacionado con mayor susceptibilidad a la enfermedad (frecuencia casos 65% frente al 51% en voluntarios sanos $p=0,0082$) tal y como se muestra en la tabla 23.

Tabla 23. Frecuencias haplotípicas MTHFR_A1298C _ TNFa G-238A.

Haplotipo (MTHFR_A1298C_ TNFa G-238A)	Frecuencia del haplotipo	Frecuencias Caso-Control	χ^2	Valor de P
AG	0,586	0,651- 0,513	6,998	0,0082
CG	0,288	0,259- 0,320	1,606	0,205
AA	0,09	0,070- 0,112	1,919	0,1659
CA	0,036	0,019- 0,055	3,195	0,0739

- Por último el haplotipo CC de los polimorfismos FCGR3A C559A_ *IL-6Rsol* se encuentra más representado en voluntarios sanos (frecuencia 19%) que en enfermos (frecuencia 9%) ($p=0,0065$) con lo que podría constituir un factor de protección frente a la enfermedad (tabla 24).

Tabla 24. Frecuencias haplotípicas FCGR3A C>A_ *IL-6Rsol* A358C.

Haplotipo (FcGR3A_IL6Rsol)	Frecuencia del haplotipo	Frecuencias Caso-Control	χ^2	Valor de P
AA	0,388	0,437- 0,331	4,14	0,0419
AC	0,252	0,257- 0,246	0,059	0,8076
CA	0,224	0,215- 0,233	0,159	0,6899
CC	0,136	0,090- 0,189	7,394	0,0065

4.3 Estudio casos-controles de expresión en neutrófilos de sangre periférica.

En la introducción se ha comentado la relevancia de los neutrófilos en el desarrollo de la enfermedad, ya que en situaciones de inflamación son capaces de interactuar y regular la actividad de otras células. Además liberan potentes proteasas, contribuyen a la destrucción de tejido y ayudan a la cronificación del proceso inflamatorio con lo que podrían constituir una nueva diana terapéutica.

En el estudio se analizó la expresión de ocho genes. Los dos primeros se corresponden con los receptores de la fracción constante de inmunoglobulina G ($Fc\gamma$), $Fc\gamma RIIIa$ y $Fc\gamma RIIIb$ cuya sobreexpresión podría provocar una activación celular mayor produciendo mayores cantidades de ROS e induciendo procesos inflamatorios que pueden generar daños en los tejidos del cartílago. Se estudiaron también JAK2 y STAT3, transductores de señal que portan las señales producidas por citoquinas hasta el propio núcleo activando la transcripción de genes concretos, destinados a favorecer aún más una respuesta inflamatoria. Por supuesto se analizó también la expresión de la citoquina central de todo el proceso, el TNF- α . La expresión del TGF- β también se analizó, debido al papel de esta

citoquina en el desarrollo de fibrosis y anquilosis (126). La expresión de IL-10 fue añadida al estudio por actuar como reguladora de la actividad inflamatoria. Por último MMP-9 se estudió por su relación directa con el daño que causa en las estructuras proteicas de los tejidos que forman el cartílago.

A continuación se representan en la tabla 25 los valores de expresión que se obtuvieron en este estudio para los 8 genes mencionados, medidos según los niveles de expresión relativa como se ha explicado anteriormente en el apartado material y métodos.

Tabla 25. Expresión en neutrófilos medida como RQ.

CONTROLES																	
	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>	<i>STAT3</i>	<i>JAK2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>IL-10</i>	<i>MMP-9</i>		<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>	<i>STAT3</i>	<i>JAK2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>IL-10</i>	<i>MMP-9</i>
C01	1,3	1,2	1,1	0,7	1,8	2,5	1,3	1,9	C23	2,7	1,3	1,4	0,3	0,9	1,9	2,6	2,1
C02	0,8	1,5	1,2	0,7	1,4	2,2	1,5	3,3	C24	0,8	0,7	0,3	1,7	0,5	0,9	0,7	1,0
C03	0,6	1,0	1,1	0,8	1,1	2,2	1,6	1,9	C25	0,5	0,6	0,3	1,5	0,8	0,6	1,1	0,9
C04	0,7	1,1	0,7	0,6	1,7	2,4	1,5	5,7	C26	0,8	0,8	0,5	1,5	1,5	1,6	1,0	0,4
C05	1,0	2,4	1,4	1,4	2,0	3,4	1,2	4,5	C27	1,3	1,0	0,9	1,1	0,9	0,9	0,4	0,3
C06	0,4	0,9	0,4	0,8	0,5	0,5	0,9	1,6	C28	2,6	1,8	2,0	0,6	1,8	2,0	1,3	1,1
C07	1,7	1,2	2,1	1,0	0,9	0,9	1,4	1,0	C29	0,5	0,6	0,6	1,5	0,4	0,5	0,2	0,4
C08	0,9	1,1	1,5	1,2	0,8	0,6	0,5	1,1	C30	0,5	0,8	0,8	2,0	0,5	1,3	2,1	1,4
C09	1,0	0,8	1,0	1,1	0,7	0,6	1,4	1,5	C31	1,0	0,5	0,8	25,7	0,4	0,5	0,5	0,5
C10	1,0	1,0	0,4	1,3	0,6	0,5	0,4	0,7	C32	1,0	0,5	0,5	2,0	0,5	1,0	0,4	0,6
C11	1,4	0,8	1,1	1,7	1,0	0,7	1,9	0,8	C33	1,0	1,9	0,5	0,9	0,6	0,5	0,3	3,6
C12	0,4	1,0	0,3	1,0	0,7	0,6	0,4	0,6	C34	0,9	0,8	0,8	0,9	0,6	0,6	0,9	1,2
C13	0,5	1,0	0,4	1,3	1,0	1,0	1,2	0,7	C35	0,9	0,9	1,5	1,8	0,7	0,5	0,9	0,3
C14	0,9	1,3	0,9	1,4	0,9	1,3	0,2	1,3	C36	0,6	1,0	0,8		1,3	0,6	0,9	0,4
C15	1,3	1,2	2,1	0,3	1,3	1,1	1,4	0,7	C37	0,6	1,4	1,7		1,5	1,0	0,9	0,6
C16	1,2	1,3	0,8	0,3	0,6	0,4	1,2	1,3	C38	1,1	1,3	1,7		2,0	2,2	2,4	3,4
C17	1,6	0,6	1,0	1,2	1,2	1,1		0,6	C39	1,0	0,9	1,6		1,6	1,4	1,3	2,9
C18	0,9	1,4	0,6	0,6	0,9	0,5	1,8	1,4	C40	2,2	1,5	4,5		2,9	0,6	2,9	1,1
C19	1,9	1,3	1,1	1,0	1,5	0,9	1,7	0,8	C41	1,3	1,9	1,3		1,7	1,8	3,0	2,6
C20	0,7	0,5	0,7	0,3	1,1	0,7	0,5	0,2	C42	1,2	1,3	1,7		1,5	1,4	1,1	0,8
C21	2,7	1,4	1,5	1,0	1,3	1,5	1,4	0,7	C43	1,4	1,5	2,7		2,5	1,7	0,9	1,2
C22	1,4	0,7	18,4	0,3	0,9	1,0	0,4	0,4	C44	1,0	1,1	0,9		1,3	2,0	1,7	3,6

PACIENTES																	
	FCGR3A	FCGR3B	STAT3	JAK2	TNF- α	TGF β I	IL-10	MMP-9		FCGR3A	FCGR3B	STAT3	JAK2	TNF- α	TGF β I	IL-10	MMP-9
P01		1,0							P30	0,3	1,0	4,6	2,5	1,4	0,6	2,6	0,1
P02	2,8	1,3	2,2	0,5	1,3	1,3	0,5	1,4	P31	3,0	1,0	6,0	1,8	2,3	0,6	2,6	0,7
P03	3,4	5,0	0,9	0,7	0,9	0,8	8,8	0,8	P32	3,7	0,8	2,9	3,1	2,9	0,4	2,7	0,7
P04	5,1	4,1	1,1	1,0	0,6	0,6	1,7	0,7	P33	1,0	1,0	3,6	4,6	2,3	1,2	11,0	1,3
P05	1,3	5,1	1,8	0,7	1,4	1,0	2,0	2,7	P34	4,9	1,7	9,4	3,4	13,9	3,6	11,6	23,6
P06								1,8	P35	1,0	1,1	3,2	1,2	0,9	0,4	1,5	0,6
P07	1,0	3,1	0,3	0,4	0,2	0,6	5,0	4,5	P36	0,3	0,8	1,3	0,9	0,6	0,6	6,4	0,8
P08	1,6	7,2	0,7	3,8	0,9	3,1	0,9	14,8	P37	0,4	0,8	1,1	1,8	0,8	1,0	2,3	3,8
P09	4,2	4,9	2,4	1,0	1,7	0,9	6,6	16,9	P38		0,9	0,5	1,2	2,8	1,7	8,6	1,3
P10	3,5	5,2	5,2	2,2	2,8	1,7	3,7	11,6	P39	0,8	2,5	0,1	2,3	0,5	0,8	1,5	3,0
P11	1,2	3,4	0,7	0,7	0,5	0,7	1,1	2,2	P40	0,3	1,5	0,2	1,3	0,6	0,6	1,8	0,7
P12	1,1	3,5	1,0	0,8	0,9	0,7	0,8	4,7	P41	0,7	5,4	1,2	6,1	1,4	2,5	4,2	4,2
P13	1,1	4,0	0,6	1,3	0,8	0,8	1,1	8,9	P42	0,3	0,7	0,4	0,4		0,6	0,1	0,4
P14	1,6	4,3	0,5	2,1	0,1	1,0	3,8	21,9	P43	6,8	64,8	4,4	1,0		24,9	55,0	10,5
P15	3,4	3,2	0,6	0,8	1,4	0,6	1,2	2,2	P47	22,6	45,0	22,9	84,5		31,1	65,6	37,7
P16	1,0	6,8	0,9	1,0	1,4	0,8	1,3	2,5	P48	41,5	46,0	60,3	79,3		209,1	135,6	191,7
P17	0,5	2,7	0,2	0,6	0,2	0,4	1,2	4,0	P49	27,4	61,1	67,8	82,9		69,2	58,5	24,9
P18	4,6	2,1	18,6		9,6	12,8	8,3	12,5	P50	16,9	12,1	42,0	47,1		11,2	9,9	5,3
P19	0,8	3,6	0,3	0,9	0,7	0,4	1,0	2,9	P51	1,5	3,7	2,6	4,3		5,3	1,2	5,9
P20	0,9	2,9	0,4	1,1	1,1	1,0	1,2	2,2	P52	4,5	0,0	0,0	0,0		0,0	1,9	0,0
P21	2,2	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4	2,1	11,3	P53	2,3	2,5	3,5	5,6		6,5	13,0	7,1
P22	5,6	2,8	1,5	0,8	2,3	1,1	2,5	7,8	P54	0,8	2,6	0,5	4,3		8,1	1,9	24,7
P23	3,3	12,3	1,3	1,5	4,9	2,0	5,5	4,9	P55	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	1,9	0,4
P24	3,6	3,2	4,1		9,7	1,3	3,0	13,2	P56	1,9	0,7	3,3	0,4		0,9	15,5	1,5
P25	7,6	4,4		3,7		4,0	10,5	27,5	P57	1,5	1,5	0,7	0,3		1,2	0,2	2,5
P26	1,4	5,3	1,8	7,2	0,9	2,6	1,7	5,8	P58	5,0	0,4	3,1	0,6		5,1	0,4	80,0
P27	0,5	3,3	0,4	4,8	1,8	0,9	1,4	2,1	P61	3,4	5,3	0,6	0,9		2,9	2,9	1,2
P29	0,8	2,0	2,1	3,9	0,3	1,3	7,7	5,5	P62	1,0	3,1	0,3	0,5		2,1	2,8	1,5

Los espacios en blanco son resultados que no se pudieron obtener por fallos experimentales y se han tenido en cuenta como “missing values” en el análisis estadístico. El primer estudio volvió a ir destinado a la comparación de expresión entre controles y pacientes. Para ello, se realiza un test no paramétrico, U de Mann-Whitney.

En cuanto al grado de activación de neutrófilos, en la figura 35 se han representado todos los valores de expresión de los genes estudiados, realizando una comparación entre individuos sanos y pacientes con artritis. Si bien, todos los genes parecen presentar valores de expresión más altos en pacientes, los genes que presentan diferencias significativas (valor de $P < 0,05$) son FCGR3A, FCGR3B, JAK2, MMP-9 e IL-10. Con estos datos podría decirse que los genes que más se expresan en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide son los de los receptores de Fc γ que favorecen la liberación de citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas y ROS; el gen que traduce MMP-9, que produce daño directo en el tejido; el de JAK2 implicado en la transducción de señales al núcleo y el de la IL-10 con un papel dual en el proceso inflamatorio.

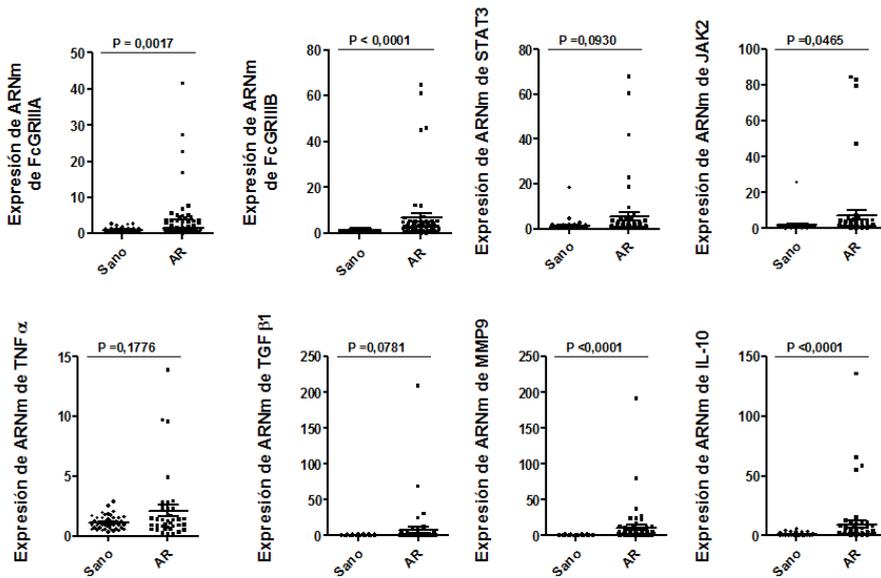


Figura 35. Diferencias de expresión en neutrófilos entre casos y controles.

Por último, se realizó un estudio de correlación mediante el método ρ de Spearman en el que se quiso probar si la expresión de alguno de estos genes puede estar relacionada con el valor de DAS28 o con la duración de la enfermedad en años. Después de realizar el estudio, no se obtuvieron correlaciones significativas entre los valores de expresión de ninguno de los genes estudiados y el valor de DAS28 o la duración de la enfermedad.

4.4 Estudio de correlaciones entre genotipo y variables clínicas en pacientes con artritis reumatoide.

En este apartado se han estudiado las posibles correlaciones entre los distintos genotipos de cada marcador y las variables clínicas de los pacientes. En ningún caso se encontró relación entre la clínica del paciente y la duración de la enfermedad o el hábito tabáquico.

Se han analizado las posibles correlaciones entre el valor de DAS28 y los distintos genotipos obtenidos mediante pruebas de hipótesis no paramétricas ya que interesaría caracterizar un marcador que se relacionara con el grado de actividad de la patología con el fin de tratar con mayor urgencia aquellos casos de artritis temprana o en los que la evolución es rápida y severa.

La presencia de los factores séricos (factor reumatoide y anticuerpos anti-péptidos citrulinados) es tomada en cuenta en el diagnóstico actual de la artritis reumatoide. La presencia de ambos se liga a la patología y mientras el factor reumatoide puede ser considerado un factor de severidad, los anticuerpos anti-péptidos citrulinados pueden encontrarse en un paciente años antes del inicio de la enfermedad. El FR se encuentra en aproximadamente el 90% de los afectados, mientras que los autoanticuerpos frente a citrulina se encuentran sólo en un subgrupo de pacientes. Con un nuevo estudio de

contingencia (χ^2 , IC 95%, valor de p corregido por Bonferroni), se estudió cómo se distribuyen los dos alelos de cada marcador en pacientes que presentan o no anticuerpos citrulinados y factor reumatoideo. El objetivo de este análisis consiste en encontrar marcadores genéticos (SNPs) que puedan relacionarse con los marcadores serológicos con el fin de poder conocer qué perfil de expresión de marcadores serológicos se asocia con qué perfil genotípico y de esta manera poder conocer una variable a partir de la determinación de la otra, además de encontrar una relación indirecta con la gravedad de la enfermedad (niveles más altos de anticuerpos se relacionan con más actividad). En la tabla 26 se muestran los resultados de los marcadores que presentan significatividad en el estudio de contingencia.

Tabla 26. SNPs asociados con presencia/ausencia de FR.

Presencia de Anticuerpo anti péptido citrulinado			
Gen/SNP	χ^2	OR (95% IC)	Valor de P
<i>SLCO1B1 rs11045879_C vs T</i>	5,85	0,5 (0,27-0,93)	0,035
Factor Reumatoide			
Gen/SNP	χ^2	OR (95% IC)	Valor de P
<i>TNF-α rs361525 (G-238A) G vs A</i>	9,12	0,7 (0,16-0,89)	0,044
<i>PTPN22 T vs C</i>	32,1	2,4 (1,35-4,79)	0,012

En este caso el alelo C del polimorfismo estudiado para el *SLCO1B1* está más representado en pacientes ACCPs negativo (OR

0,5 (0,27-0,93) $p=0,035$). El alelo G del polimorfismo estudiado para el TNF- α rs361525 (G-238A) se asocia a la ausencia de factor reumatoide (OR 0,7 (0,16-0,89) $p=0,044$) mientras que el alelo T del PTPN22 T vs C se asocia a la presencia del mismo (OR 2,4 (1,35-4,79) $p=0,012$).

A continuación el estudio se centró en variables clínicas que se asocian con la gravedad de la enfermedad. En este sentido se realizaron dos estudios de correlación entre las variantes alélicas de los marcadores y las manifestaciones extra-articulares y entre las variantes alélicas y el pinzamiento articular y la presencia de erosiones. En la tabla 27 se presentan aquellas correlaciones para las que se obtuvo significatividad estadística.

Tabla 27. Asociación entre pinzamiento articular SNP PTPN22 C1858T.

Presencia de Pinzamiento articular			
Gen/SNP	χ^2	OR alelo C (95% IC)	Valor de P
<i>PTPN22 C1858T</i>	9,12	0,8 (0,20-0,90)	0,031

En este caso el alelo el alelo C del SNP PTPN22 C1858T se asociaría con una menor incidencia de pinzamiento articular (OR 0,8 (0,20-0,90) IC 95% $p=0,031$).

En cuanto al grado de actividad de la enfermedad relacionada con el genotipo los resultados obtenidos se muestran en la figura 36:

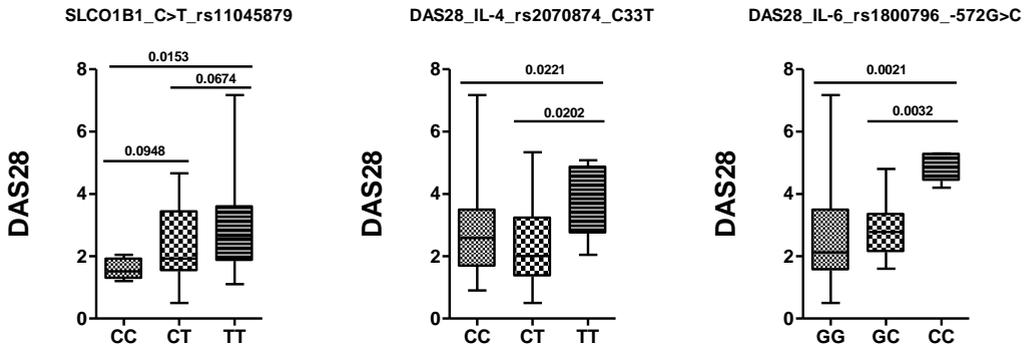


Figura 36. Relación entre la actividad de la enfermedad medida mediante la escala DAS 28 y el genotipo. Estudio no paramétrico de kruskal wallis.

El alelo T del SLCO1B1 se asocia a mayor actividad de la enfermedad ya que se observa que individuos homocigotos para este alelo presentan mayor actividad frente a individuos homocigotos para el alelo C ($p=0,0153$). En cuanto a la IL-4 parece que los individuos homocigotos para el alelo T de nuevo presentan un mayor grado de actividad de la enfermedad que aquellos heterocigotos ($p=0,0202$) y que aquellos homocigotos para el alelo C ($p=0,0221$). Finalmente los individuos homocigotos para el alelo C del polimorfismo estudiado para la IL-6 presentaron también un mayor grado de actividad que los

individuos heterocigotos ($p=0,0032$) y que aquellos que fueron homocigotos para el alelo G ($p=0,0021$).

4.5 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y variables clínicas en pacientes con artritis reumatoide.

En este caso no se encontraron correlaciones con significación estadística entre los valores de expresión y las características clínicas estudiadas.

4.6 Estudio de correlaciones entre genotipo y respuesta a MTX.

La tabla 28 recoge las características clínicas de los pacientes agrupados según la respuesta o ausencia de respuesta a MTX. En ella se observa que las poblaciones son similares y que únicamente existen diferencias significativas en cuanto al hábito tabáquico y evidentemente en cuanto a la respuesta al fármaco. Se observa que entre los pacientes no respondedores hay mayor número de fumadores (37% frente al 26% $p=0,042$).

Tabla 28. Características clínicas pacientes respondedores y no respondedores a MTX

DATOS CLÍNICOS	RESPONDEDORES (n=45)	NO RESPONDEDORES (n=35)	Valor de <i>P</i>
EDAD (AÑOS), media ± SD	51,3 ± 10,3	53,1 ± 12,4	0,48
SEXO FEMENINO n (%)	34 (75,5)	28 (80)	0,52
DAS28 media ± SD	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,5	0,26
DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD (AÑOS), media ± SD	7,1 ± 6,4	8,9 ± 5,7	0,24
FACTOR REUMATOIDE POSITIVO, n (%)	37 (82,2)	26 (74,3)	0,091
ACCP POSITIVO, n (%)	29 (64,4)	21 (60)	0,54
FUMADORES (%)	12 (26,6)	13 (37,1)	0,042
MEDIA DOSIS MTX mg (min-max)	15 (12,5-25)	18 (12,5-25)	0,28

Con los datos recogidos se estudió la posible asociación entre la respuesta al fármaco y los polimorfismos genéticos. Los resultados para los análisis realizados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 29. Polimorfismos estudiados y su asociación a la respuesta a MTX.

	RESPONDEDORES (n=45)	NO- RESPONDEDORES (n=35)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
MTHFR					
rs1801133					
CC	16 (35,5)	11 (31,4)	0,221	1,07 (0,75-1,37)	0,891
CT	24 (51,3)	20 (57,1)			
TT	5 (11,1)	4 (11,4)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
C	58,1	60,2	0,051	1,1 (0,63-1,64)	0,823
rs1801131					
AA	23 (51,1)	17 (48,6)	0,107	1,06 (0,72-1,58)	0,741
AC	19 (42,2)	16 (45,7)			
CC	3 (6,6)	2 (5,7)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
A	70,8	74,3	0,262	0,98 (0,54-1,37)	0,608
SLCO1B1					
rs11045879					
CC	0 (0)	2 (5,7)	0,008	1,01 (0,62-1,65)	0,911
CT	15 (33,3)	9 (25,7)			
TT	30 (66,6)	24 (68,6)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
C	16,7	17,1	0,007	1,08 (0,78-1,59)	0,937

	RESPONDEDORES (n=45)	NO- RESPONDEDORES (n=35)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
TNFα					
rs1799724					
TT	33 (73,3)	28 (80)	0,277	1,18 (0,62-2,23)	0,599
TC	9 (20)	7 (20)			
CC	3 (6,7)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
T	86,7	88,6	0,145	1,04 (0,59-1,74)	0,703
rs1800629					
GG	39 (86,6)	30 (87,7)	0,151	1,15 (0,58-2,26)	0,698
GA	5 (11,1)	5 (14,3)			
AA	1 (2,2)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
A	8,6	7,5	0,07	1,02 (0,61-1,64)	0,792
rs361525					
GG	39 (86,7)	29 (82,8)	0,543	1,27 (0,69-2,34)	0,461
GA	4 (8,9)	6 (17,1)			
AA	2 (4,4)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
G	89,2	94,3	1,422	1,14 (0,68-1,87)	0,233
IL-10					
rs1800896					
GG	5 (11,1)	8 (22,8)	2,864	1,79 (0,78-4,08)	0,091
GA	24 (53,3)	11 (31,4)			
AA	16 (35,5)	16 (45,7)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
G	37,5	38,6	0,022	1,05 (0,54-1,67)	0,883

	RESPONDEDORES (n=45)	NO- RESPONDEDORES (n=35)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
IL-4					
rs2070874					
CC	30 (66,6)	23 (65,7)	0,146	1,09 (0,69-1,68)	0,703
CT	14 (31,1)	9 (25,7)			
TT	1 (2,2)	3 (8,5)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
T	16,7	24,3	2	1,03 (0,62-1,81)	0,201
TNFRSF1B					
rs1061622					
GG	31 (68,8)	28 (80)	0,939	1,23 (0,82-1,85)	0,332
TG	14 (31,1)	7 (20)			
TT	1 (2,2)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
T	15,8	20,1	0,535	1,01 (0,59-1,78)	0,464
FCGR3A					
rs396991					
AA	18 (40)	19 (54,3)	0,77	1,30 (0,48-5,31)	0,38
AC	22 (48,8)	14 (40)			
CC	5 (1,1)	2 (5,7)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
A	69,2	70,4	0,014	0,98 (0,61-1,81)	0,9042
FCGR2A					
rs1801274					
AA	8 (17,7)	7 (20)	0,042	1,06 (0,58-1,61)	0,838
AG	30 (66,6)	20 (57,1)			
GG	7 (15,5)	8 (22,8)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
A	45,8	50,2	0,308	1,12 (0,64-1,98)	0,579

	RESPONDEDORES (n=45)	NO- RESPONDEDORES (n=35)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
STAT4					
rs7574865					
GG	26 (57,7)	14 (40)	2,841	1,41 (0,93-2,11)	0,092
GT	15 (33,3)	16 (45,7)			
TT	4 (8,8)	4 (11,4)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
T	22,5	32,9	2,446	1,14 (0,71-1,95)	0,118
PTPN22					
rs2476601					
CC	32 (71,1)	33 (94,3)	6,911	3,55 (1,96-13,1)	0,009
CT	12 (26,6)	2 (5,7)			
TT	1 (2,2)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
T	15,8	2,5	5,758	3,48 (1,84-9,47)	0,016
IL-6R					
rs2228145					
AA	14 (31,1)	17 (48,6)	2,301	1,13 (0,78-3,51)	0,316
AC	23 (51,1)	14 (40)			
CC	8 (17,7)	4 (11,4)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
A	62,5	70,1	1,097	1,11 (0,67-2,87)	0,295
IL-6					
rs1800796					
CC	35 (77,7)	33(94,3)	0,235	1,07 (0,58-1,97)	0,628
GC	8 (17,7)	2 (2,2)			
GG	2 (4,4)	0 (0)			
<i>ALELO de respuesta</i>					
C	90,8	92,9	0,381	1,11 (0,61-1,81)	0,411

El único polimorfismo para el que se han obtenido diferencias significativas entre presencia del mismo y respuesta a MTX es el alelo T del PTPN22 C1858T, que se asocia a mayor probabilidad de que exista una buena respuesta al fármaco (OR 3,48 (1,84-9,47) $p=0,016$).

4.7 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y respuesta a MTX.

En este estudio se comparó la expresión de los ocho genes estudiados entre aquellos pacientes que respondieron o no al MTX obteniéndose la distribución que se muestra en la figura siguiente:

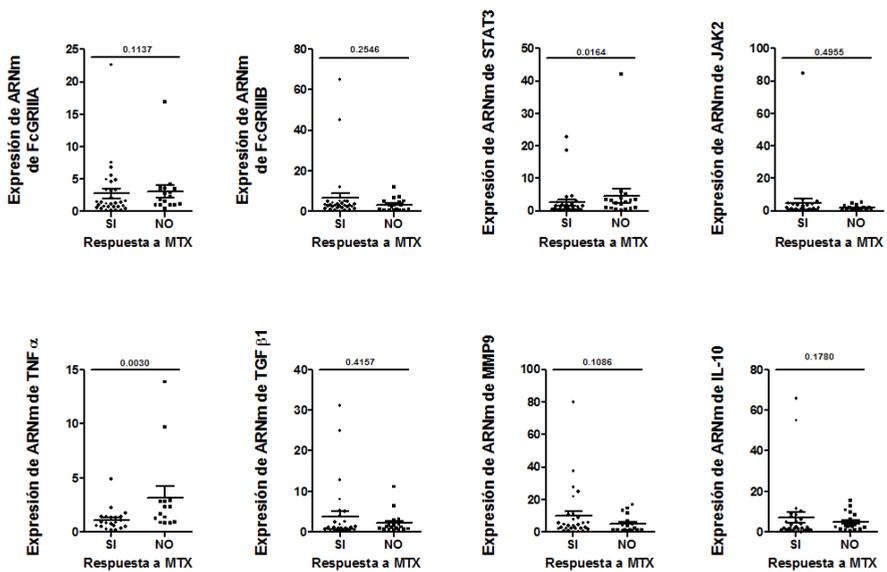


Figura 37. Relación entre la expresión en neutrófilos y la respuesta a MTX. Se realizó una prueba estadística de U Mann Whitney para

analizar las diferencias entre respondedores y no respondedores. Las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

La distribución en la expresión sólo mostró diferencias significativas para los genes STAT3 ($p=0,0164$) y TNF alfa ($p=0,0030$), en el resto de los casos la expresión es similar entre respondedores y no respondedores.

4.8 Estudio de correlaciones entre genotipo y toxicidad a MTX.

De los 80 pacientes con AR tratados con MTX 14 de ellos tuvieron reacciones adversas a MTX. Doce de ellos tuvieron reacciones adversas de tipo gastrointestinal (náuseas y vómitos), uno de ellos presentó reacciones hematológicas (hemoglobina < 10 g/dL) y un paciente presentó aumento de las enzimas hepáticas aminotransferasas. Las características clínicas de los pacientes que presentaron reacciones adversas no presentaron diferencias significativas frente a los pacientes que presentaron buena tolerancia a MTX (tabla 30). Únicamente se observó que los pacientes que tuvieron reacciones adversas presentaron en menor porcentaje ACCP positivos.

Tabla 30. Características clínicas de los pacientes que desarrollaron y que no desarrollaron toxicidad a MTX.

DATOS CLÍNICOS	TOXICIDAD A MTX (n=14)	NO TOXICIDAD A MTX (n=66)	Valor de P
EDAD (AÑOS), media \pm SD	54,7 \pm 15,2	51,8 \pm 14,2	0,29
SEXO FEMENINO n (%)	3 (21,4)	15 (22,7)	0,19
DAS28 media \pm SD	4,3 \pm 0,8	4,1 \pm 0,6	0,31
DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD (AÑOS), media \pm SD	9,6 \pm 5,4	7,4 \pm 6,2	0,084
FACTOR REUMATOIDE POSITIVO, n (%)	11 (78,5)	54 (81,8)	0,34
ACCP POSITIVO, n (%)	6 (42,8)	46 (69,6)	0,041
FUMADORES (%)	5 (35,7)	23 (34,8)	0,47
MEDIA DOSIS MTX mg (min-max)	15 (12,5-25)	15 (12,5-25)	1

En cuanto al análisis genotípico, éste mostró que el alelo C del rs11045879 del gen SLCO1B1 se correlacionó con la presencia de reacciones adversas a MTX (tabla 31). El resto de marcadores estudiados no se asociaron a la presencia de efectos adversos.

Tabla 31. Polimorfismos relacionados con la toxicidad por metotrexato.

	TOXICIDAD (n=14)	NO TOXICIDAD (n=66)			
Gen/ SNPs	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
MTHFR					
rs1801133					
CC	6 (42,8)	22 (33,3)	0,638	1,21 (0,64-3,14)	0,728
CT	7 (50,1)	37 (56,1)			
TT	1 (7,1)	8 (12,1)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
C	(58,8)	(60,1)	0,016	1,42 (0,54-3,68)	0,898
rs1801131					
AA	8 (57,1)	33 (50,1)	1,948	1,10 (0,77-1,25)	0,378
AC	4 (28,6)	30 (45,5)			
CC	2 (14,3)	4 (6,1)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
A	(71,9)	(73,3)	0,027	1,31 (0,49-3,41)	0,871
SLCO1B1					
rs11045879					
CC	2 (14,3)	1 (1,5)	6,335	3,84 (1,57-14,12)	0,032
CT	2 (14,3)	21 (31,8)			
TT	10 (71,4)	45 (68,2)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
C	(28,6)	(16,1)	4,141	2,71 (0,89-9,17)	0,037

	TOXICIDAD (n=14)	NO TOXICIDAD (n=66)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
TNFα					
rs1799724					
TT	12 (85,7)	51 (77,3)	1,776	1,51 (0,42-6,96)	0,414
TC	2 (14,3)	13 (19,7)			
CC	0 (0)	3 (4,5)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
T	(13,3)	(12,5)	0,016	1,08 (0,59-4,41)	0,899
rs1800629					
GG	12 (85,7)	59 (89,4)	0,059	1,18 (0,31-4,53)	0,808
GA	2 (14,3)	8 (12,1)			
AA	0 (0)	1 (1,5)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
A	(10,1)	(7,5)	0,217	1,14 (0,52-3,47)	0,641
rs361525					
GG	10 (71,4)	58 (87,9)	1,295	1,7 (0,54-5,28)	0,523
GA	3 (21,4)	8 (12,1)			
AA	1 (7,2)	3 (4,6)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
G	13,3	8,1	0,841	1,21 (0,61-2,84)	0,359
IL-10					
rs1800896					
GG	2 (14,3)	11 (16,7)	0,795	1,14 (0,29-4,53)	0,735
GA	5 (37,7)	31 (46,9)			
AA	7 (50,1)	25 (37,9)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
G	(70,1)	(60,6)	0,941	1,08 (0,47-2,71)	0,331

	TOXICIDAD (n=14)	NO TOXICIDAD (n=66)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
IL-4					
rs2070874					
CC	10 (71,4)	44 (66,7)	2,721	1,2 (0,42-3,47)	0,257
CT	2 (14,3)	19 (28,9)			
TT	2 (14,3)	3 (4,5)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
T	(23,3)	(18,8)	1,241	1,08 (0,67-1,97)	0,256
TNFRSF1B					
rs1061622					
GG	11 (78,6)	49 (72,1)	0,178	1,05 (0,85-1,30)	0,673
TG	3 (21,4)	18 (26,5)			
TT	0	1 (1,5)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
T	(86,7)	(81,9)	0,404	1,10 (0,85-1,29)	0,254
FCGR3A					
rs396991					
AA	7 (50,1)	30 (44,8)	0,693	1,11 (0,73-1,68)	0,707
AC	5 (35,7)	31 (46,3)			
CC	2 (14,2)	6 (8,9)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
A	(76,7)	(68,1)	0,869	1,15 (0,68-1,87)	0,351
FCGR2A					
rs1801274					
AA	2 (14,3)	13 (19,4)	0,206	1,06 (0,84-1,36)	0,902
AG	9 (64,3)	41 (61,2)			
GG	3 (21,4)	13 (19,4)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
G	(56,7)	(51,9)	0,233	1,01 (0,51-2,14)	0,629

	TOXICIDAD (n=14)	NO TOXICIDAD (n=66)			
Gen/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95 % CI)	VALOR P
STAT4					
rs7574865					
GG	7 (50)	35 (52,2)	0,103	1,09 (0,35-3,46)	0,951
GT	6 (42,9)	26 (38,8)			
TT	1 (7,1)	6 (9)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
T	(76,7)	(73,1)	0,163	1,01 (0,83-1,24)	0,686
PTPN22					
rs2476601					
CC	11 (78,6)	55 (80,9)	0,095	1,05 (0,79-1,37)	0,758
CT	3 (21,4)	12 (17,6)			
TT	0 (0)	1 (1,5)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
T	(13,3)	(11,2)	0,107	1,04 (0,79-1,37)	0,743
IL-6R					
rs2228145					
AA	7 (50)	25 (37,3)	1,048	1,53 (0,59-3,95)	0,592
AC	6 (42,9)	32 (47,8)			
CC	1 (7,1)	10 (14,9)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
A	(70,1)	(64,4)	0,353	1,11 (0,48-3,45)	0,553
IL-6					
rs1800796					
CC	0 (0)	2 (3)	2,94	1,16 (0,61-3,11)	0,230
GC	0 (0)	10 (14,9)			
GG	14 (100)	55 (82,1)			
<i>ALELO de toxicidad</i>					
C	(13,3)	(7,5)	1,11	1,19 (0,51-2,94)	0,291

4.9 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y toxicidad a MTX.

En este apartado se estudió la posible correlación entre el grado de activación en neutrófilos y la presencia o ausencia de toxicidad asociada a MTX. Del resultado de este estudio se desprende que no existe asociación entre estas variables y por tanto el desarrollo de reacciones adversas a MTX no se vería influenciado por el grado de activación de los neutrófilos en pacientes con AR (figura 38).

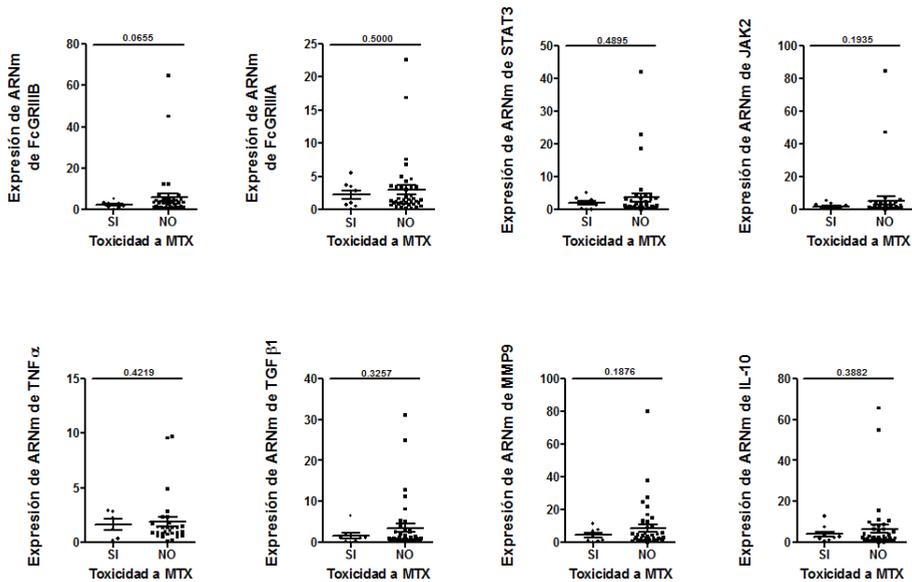


Figura 38. Relación entre la expresión en neutrófilos y la toxicidad a MTX medida con el test U de mann whitney.

4.10 Estudio de correlaciones entre genotipo y respuesta/toxicidad a anti-TNF- α .

En este subestudio se identificaron 24 pacientes en tratamiento con anti-TNF- α . Entre estos pacientes 14 presentaron una buena respuesta al tratamiento mientras que 10 de ellos presentaron una mala respuesta. Las características clínicas y demográficas de estos pacientes se muestran en la tabla 32:

Tabla 32. Características clínicas de los pacientes respondedores y no respondedores a anti- TNF- α .

DATOS CLÍNICOS	RESPONDEDORES (n=14)	NO RESPONDEDORES (n=10)	Valor de P
EDAD (AÑOS), media \pm SD	54 \pm 9	53 \pm 8	0,56
SEXO FEMENINO n (%)	10 (71)	9 (65)	0,52
DAS28 media \pm SD	2,24 \pm 1,2	1,96 \pm 0,9	0,26
DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD (AÑOS), media \pm SD	6,1 \pm 3,4	9,3 \pm 3,6	0,24
FACTOR REUMATOIDE POSITIVO, n (%)	9 (64)	7 (70)	0,91
ACCP POSITIVO, n (%)	8 (57)	5 (36)	0,54
FUMADORES (%)	4 (28)	4 (40)	0,042

El bajo número de sujetos en tratamiento con anti-TNFs encontrado en nuestro estudio hace que en la mayoría de casos el número de pacientes pertenecientes a cada grupo de los polimorfismos estudiados (homocigoto wild-type, heterocigoto, homocigoto) sea 0 o de un paciente por grupo con lo que la tabla completa de polimorfismos no puede construirse y dado el número tan bajo de pacientes tampoco tendría interés. En este caso el único polimorfismo que ha mostrado asociación a la respuesta a anti-TNF es el estudiado para el PTPN22, concretamente el alelo T se asocia a mejor respuesta a anti-TNF (OR 3,123 (1,92-5,01) P=0,001):

Tabla 33. Polimorfismo asociado a la respuesta a anti-TNF.

Gen/ SNP	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Chi cuadrado	P
PTPN22_C1858T	Alelo T: 3,123 (1,92-5,01)	Alelo C: 0,63 (0,421-0,813)	10,181	0,001

Por otro lado y dado el bajo tamaño muestral en especial de pacientes en tratamiento con anti-TNFs no se ha hallado asociación con la toxicidad, ya que no se identificó ningún paciente con efectos adversos asociados a los anti-TNF más allá de la reacción habitual de irritación local en un bajo número de sujetos (2). En el resto de los pacientes en tratamiento con este sub-grupo de fármacos biológicos, el

fármaco fue bien tolerado y si se produjo la retirada del mismo fue por ineficacia.

4.11 Estudio de correlaciones entre expresión en neutrófilos y respuesta/ toxicidad a anti-TNF- α .

En este subapartado de nuevo, dado el bajo número de pacientes que fueron tratados con anti-TNFs y el bajo número de muestras viables para la extracción de ARN, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos.

5. Discusión:

El presente trabajo de tesis doctoral se ha focalizado en la posible asociación entre diferentes variantes genéticas y de expresión neutrofilica con la posibilidad de padecer AR así como de la respuesta y toxicidad al tratamiento con MTX y anti-TNF- α . Entre los principales resultados del presente trabajo de tesis doctoral destacan:

- 1) La presencia de cuatro polimorfismos genéticos localizados en los genes MTHFR_A1298C, TNF α -238G>A, FCGR3A_C559A y PTPN22_C1858T asociados con la presencia de enfermedad; 2) La existencia de 4 haplotipos o combinaciones de marcadores genéticos correlacionados con la presencia de enfermedad; 3) El mayor grado de activación de neutrófilos en pacientes respecto a individuos sanos, medida por la sobreexpresión de mediadores inflamatorios; 4) La asociación de la expresión de factor reumatoide a la presencia de los polimorfismos T en el caso de la región estudiada del gen PTPN22 y G en el caso de la región promotora -238 del TNF alfa; 5) Se obtuvo una correlación entre el polimorfismo PTPN22_C1858T y la respuesta a MTX y entre este mismo polimorfismo y la respuesta a anti-TNF- α . Además se ha observado que existe una asociación entre la expresión en neutrófilos de los genes STAT3 y TNF- α y la respuesta a MTX; 6) Por último se observó la presencia de asociación entre el polimorfismo

SLCO1B1_rs11045879 y la toxicidad derivada del tratamiento con MTX.

Los resultados obtenidos en este estudio objeto de tesis doctoral aportan nueva evidencia sobre la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad así como de la influencia de la carga genética en la respuesta y toxicidad al tratamiento, lo cual puede ser de potencial utilidad a la hora de manejar el diagnóstico, evolución y tratamiento de los pacientes con AR en esta área geográfica.

Entrando en detalle en los resultados, encontramos que nuestra población de estudio podría considerarse representativa de la población caucásica a nivel de los perfiles genéticos estudiados, lo que se confirma con la ausencia de diferencias significativas a nivel de los polimorfismos presentes en dichos genes entre la población del estudio Hap Map y nuestra muestra. Además se confirma que en estos genes no se ha producido ningún tipo de alteración genética y que la herencia de los mismos no se ha visto modificada por factores externos o mutaciones somáticas lo que se confirma con el estudio del equilibrio de Hardy Weinberg. Este equilibrio se cumple para todos los polimorfismos estudiados.

Como se ha resaltado previamente en el subestudio de diferencias genotípicas entre casos y controles, se han identificado 4

polimorfismos más presentes en individuos enfermos que en sanos. El primer SNP se relaciona con la actividad de la MTHFR, enzima muy importante en la regeneración de folato reducido, fundamental en la síntesis de purinas, que se ha relacionado más con los efectos del tratamiento con MTX que con la propia enfermedad. Como ya se ha comentado el MTX inhibe indirectamente esta enzima y se ha observado que el polimorfismo A1298C en este gen da como resultado una variante termolábil con detrimento de la actividad enzimática habiéndose descrito un amplio rango de efectos clínicos asociados: algunos estudios proponen la existencia de una eficacia incrementada de MTX (127), una mayor susceptibilidad para presentar la enfermedad AR (114) y un incremento en la toxicidad (128-130). En nuestro caso es el alelo A del SNP A1298C el que se ha encontrado más representado en la población enferma, mientras que en estudios previos es el polimorfismo CC el que se ha hallado más frecuentemente en pacientes con AR (114), aunque al estudiar en profundidad la distribución de los alelos no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. De otros estudios previos se desprende que no existen diferencias entre individuos sanos y enfermos en cuanto a la distribución de este polimorfismo (131, 132) y en nuestro caso el nivel de significación

estadística se encuentra al límite ($p=0,0461$) lo que hace pensar que el resultado pueda no ser clínicamente significativo.

El siguiente polimorfismo estudiado que mostró diferencias con significación estadística se localiza en el gen $TNF\alpha$ en la región promotora, concretamente en el locus -238. En este caso de los posibles alelos (G/A) es el G el que se ha encontrado más frecuentemente en nuestra población enferma (OR; IC 95% Alelo G: 1,487 (1,098-2,014) $p=0,0279$). Los estudios publicados hasta el momento no son concluyentes en cuanto a la aportación de éste SNP al riesgo de sufrir AR (118, 133). De hecho los estudios publicados no han podido establecer una relación con la patología, aunque sí con la evolución de la misma, habiéndose descrito el alelo GG como un factor de riesgo para la mayor incidencia de erosiones articulares (118). Por otro lado se han obtenido resultados contradictorios en cuanto a la producción de $TNF\alpha$. En diferentes estudios se ha descrito un aumento en los niveles de $TNF\alpha$ tanto en los pacientes portadores del alelo A como en los portadores del alelo G (134, 135). Por otro lado los portadores del alelo GA se encontrarían asociados a un desarrollo más leve de la enfermedad (118). El alelo más prevalente es en nuestro caso el que se ha visto asociado a la patología, lo que tiene sentido teniendo en cuenta que se ha relacionado en otros estudios con

formas más graves de la patología acompañadas de títulos elevados de FR (118). El propio FR se baraja como posible desencadenante del proceso patológico por su participación en la formación de ICs (136). Es necesario en cualquier caso aumentar el tamaño muestral para poder establecer la fiabilidad de este resultado.

El alelo estudiado para el FcγRIIIA es el tercer polimorfismo que mostró asociación con la enfermedad. En este caso el cambio de alelo supone un cambio en la proteína traducida de una valina en posición 158 a una fenilalanina (Val158Phe; *rs396991* C>A). Concretamente el alelo C es el que se encuentra más frecuentemente en pacientes (OR; IC 95% Alelo C: 1,650 (0,994-2,913) p=0,0181). En este caso los resultados publicados son controvertidos ya que la distribución de este SNP difiere en función de la población de estudio. En un estudio en población sueca fue el polimorfismo 158VV el más frecuente en población enferma, aunque al estratificar por sexo esta mayor prevalencia no se observó en población femenina, en la que además se observó que aquellas que poseían la variante 158PP tenían una forma más grave de la patología con valores más elevados de DAS28 (103). En otro estudio llevado a cabo en población caucásica se observó que el polimorfismo 158VV no se encontró más representado en población enferma aunque sí hubieron diferencias

estadísticamente significativas cuando se estratificaron los pacientes realizando el análisis con los AACP positivos (137). Por último nuestros datos son corroborados por un meta análisis desarrollado en 2008 basado en 10 estudios diferentes. Este estudio mostró una asociación del polimorfismo rs396991 CC con la presencia de enfermedad en población europea, hecho que no se cumplió para población asiática (138). En cuanto al mecanismo por el que podría influir en la aparición de la enfermedad, actualmente se sabe que este polimorfismo genera un receptor que se une con mayor afinidad a la Fc de la IgG1 e IgG3, lo que provoca una mayor afluencia de calcio al interior de la célula y por tanto mayor activación de las células portadoras de este receptor (NKs, monocitos etc) (103).

Para finalizar el apartado de polimorfismos asociados a la enfermedad, el alelo T del SNP PTPN22_C1858T se ha encontrado más frecuentemente en individuos enfermos que en sanos. Respecto a los datos publicados hasta el momento, en un meta análisis basado en un total de 32 estudios se observó que dicho alelo se encontraba más frecuentemente en individuos enfermos con un OR de 1,62 ($p < 0,001$), aunque esta diferencia, de nuevo, no se observó en población asiática. Hasta el momento este polimorfismo es el que con mayor fuerza se ha asociado a la patología fuera de la región HLA (139). Este gen

codifica una proteína tirosin fosfatasa que se expresa mayoritariamente en tejido linfoide. Esta enzima está implicada en múltiples vías de señalización asociadas a la respuesta inmunitaria y tiene un papel fundamental en la inhibición de la activación de linfocitos T y B. Este polimorfismo se asocia a un fallo en esta inhibición, lo que hace que este grupo celular esté sobre estimulado y contribuye a la cronificación de la respuesta inmunitaria (124).

Previamente ya hemos comentado la importancia de la contribución genética conjunta al riesgo de padecer enfermedades autoinmunes. En nuestro estudio hemos identificado cuatro haplotipos que podrían influir en la aparición de la enfermedad ya que muestran una distribución con diferencias estadísticamente significativas entre individuos enfermos y sanos. El primer haplotipo identificado es el correspondiente a los alelos ACC localizados en los genes $TNF\alpha$ G-238A, FCGR3A 559C>A y PTPN22 C1858T respectivamente. Este haplotipo podría tener un papel protector frente a la enfermedad ya que se ha localizado con mayor frecuencia en individuos sanos (8% frente al 2% $p=0,0055$). La presencia del alelo G en la región promotora del $TNF\alpha$ se ha asociado a formas más graves de la patología y en nuestro estudio este polimorfismo aislado se ha asociado a la presencia de enfermedad, con lo que los resultados

concuerdan, aunque, como ya se ha comentado, de momento no se puede establecer la asociación firme con la enfermedad en base a los estudios publicados hasta el momento. En el apartado anterior ya se ha comentado que el gen FCGR3A 559C>A presenta resultados contradictorios en nuestro caso el alelo C en asociación con los alelos A para el TNF α -238 y C para el alelo PTPN22C1858T se asocia a un menor riesgo de padecer la enfermedad. En cuanto al alelo T del PTPN22 C1858T como ya se ha comentado se encontró más relacionado en individuos enfermos que en sanos con lo que se puede asumir que el alelo C sea más frecuente en individuos sanos tal y como muestra nuestro análisis.

El siguiente haplotipo identificado fue el conformado por los alelos AA de los SNPs MTHFR A1298C y FCGR3A 559C>A presente con mayor frecuencia en individuos enfermos que en individuos sanos en este caso (50% frente a 38% $p = 0,027$). Este resultado se ve respaldado por publicaciones anteriores en el caso del MTHFR A1298C (114) así como por el análisis de polimorfismos aislados realizados en nuestro estudio (apartado anterior). Igualmente el alelo C del polimorfismo FCGR3A 559C>A se ha asociado en este estudio con menor incidencia de la enfermedad por lo que es lógico

que el alelo A se encuentre más frecuentemente en individuos enfermos como ocurre en este caso.

El tercer haplotipo identificado es el conformado por los alelos AG de los polimorfismos MTHFR A1298C y TNF α G-238A respectivamente. En este caso la frecuencia en los individuos enfermos fue del 65% frente al 51% en los sanos ($p=0,0082$). En ambos casos la presencia de dichos polimorfismos por separado se ha asociado, en nuestro estudio, a mayor riesgo de padecer la enfermedad y por tanto es lógico que en conjunto puedan tener una contribución más importante al desarrollo de la patología.

Por último los alelos CC de los polimorfismos FCGR3A 559C>A e IL-6Rsol A358C parecen asociarse a la ausencia de enfermedad (frecuencia en individuos sanos 19% frente al 9% en individuos enfermos $p=0,0065$). El alelo C ya se ha asociado previamente a la ausencia de enfermedad en el caso del polimorfismo estudiado para el gen FCGR3A y aunque en nuestro estudio no se han obtenido resultados relevantes para el polimorfismo estudiado en el gen que codifica el receptor soluble de la IL-6, en estudios previos si que se ha descrito una mayor presencia del alelo C en individuos sanos frente a enfermos de AR (140).

En cuanto al grado de activación de neutrófilos, aunque todos los marcadores parecen presentar valores de expresión más altos en pacientes, los genes que presentan diferencias significativas (valor de $P < 0,05$) son FCGR3A, FCGR3B, JAK2, MMP-9 e IL-10. Con estos datos podría decirse que los genes que más se expresan en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide son los de los receptores de la fracción constante de inmunoglobulina G, que favorecen la liberación de citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas y ROS; el gen de la MMP-9 que produce daño directo en el tejido, el de JAK2 implicado en la transducción de señales proinflamatorias al núcleo y el de la IL-10 que actúa frenando la respuesta inmunitaria, aunque parece ser que no alcanza la concentración suficiente para frenar la respuesta inmunológica en pacientes con artritis reumatoide.

En cuanto a los receptores de la fracción constante de inmunoglobulinas, actualmente la literatura se basa principalmente en el estudio de los polimorfismos y su relación con la aparición de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide. También se han publicado artículos centrados en la expresión de variantes de estos receptores en neutrófilos con menor afinidad por inmunoglobulinas, lo que supone un menor aclaramiento

de inmunocomplejos y por tanto formas más agresivas de AR (141-143). La sobreexpresión de estos receptores se ha descrito previamente en otros grupos celulares como monocitos en pacientes con AR (144), pero bajo nuestro conocimiento es la primera vez que se realiza este estudio en neutrófilos de pacientes con AR, con lo que se trata de un resultado novedoso aunque es difícil de interpretar por la falta de precedentes publicados.

El tercer gen sobre-expresado en neutrófilos de pacientes fue el JAK2. Este gen codifica una proteína tirosin kinasa que se encuentra en contacto con un receptor de membrana de citoquinas y de factores de crecimiento. Se encarga de propagar las señales que llegan a la célula a través de segundos mensajeros y ciertos polimorfismos en el mismo se han relacionado con alteraciones hematológicas, procesos autoinmunes e inmunodeficiencias (145). El bloqueo de la actividad de esta enzima es una estrategia terapéutica que se está aplicando desde hace relativamente poco, concretamente tofacitinib fue aprobado en 2013 por la FDA como tratamiento para la AR. De este modo se pretende frenar el proceso de señalización intracelular y no sólo el de señalización intercelular mediante el bloqueo de la acción de citoquinas (146). Bajo nuestro conocimiento no existen de momento estudios publicados que relacionen el grado de expresión de

esta proteína en neutrófilos con la AR, sin embargo el hecho de que se encuentre en mayor concentración en el citoplasma de neutrófilos procedentes de pacientes, supone que las señales pro inflamatorias lleguen al núcleo más rápido y con mayor frecuencia. El resultado de esta actividad acelerada es mayor producción de mediadores y proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria.

La MMP-9 juega un papel fundamental en la destrucción del cartílago degrada gelatina, elastina, fibronectina, proteoglicanos y colágeno tipo IV; V; VII; X y XI (147). Los neutrófilos expresan de forma constitutiva esta enzima mientras que otras células del sistema inmunitario sólo la sintetizan al activarse. En el caso de los neutrófilos la activación celular provoca la liberación de MMP-9 a partir de gránulos de almacenamiento al medio extracelular, lo que provoca daño directo sobre los tejidos (147). La sobre-expresión de esta enzima en pacientes de AR se ha confirmado en múltiples estudios (147-149). Además los neutrófilos parecen ser el grupo celular que más expresa MMP-9 en líquido sinovial de articulaciones con sinovitis crónica (150). Estos datos respaldan nuestros resultados y confirman que los neutrófilos pueden constituir una nueva diana terapéutica, así como las enzimas que generan, incluyendo la MMP-9, lo que conseguiría frenar o reducir la destrucción articular.

La IL-10 es una de las citoquinas inmunoreguladoras. Parece frenar la respuesta inmunitaria y se ha barajado como posible tratamiento de la patología, aunque los resultados clínicos no han sido relevantes en los ensayos llevados a cabo por el momento. Se han descubierto diferentes funciones estimuladoras e inhibidoras ejercidas por la IL-10 sobre una variedad de tipos celulares. El potencial terapéutico de la IL-10 como agente antiinflamatorio deriva básicamente de su capacidad para inhibir los monocitos/macrófagos. In vitro disminuye la producción de citocinas inducidas por LPS, como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α , así como la de quimiocinas (proteína inflamatoria del macrófago). En estas situaciones, además, la IL-10 suprime la síntesis por parte de macrófagos de radicales libres y óxido nítrico, bloquea la producción de colagenasa intersticial y gelatinasa B dependiente de COX-2, y promueve la liberación de la porción soluble del receptor p75 del TNF α y de antagonistas del receptor de IL-1. Esto otorgaría a la IL-10 interesantes propiedades inmunoreguladoras, de aplicación terapéutica en la artritis reumatoide (151). Sin embargo, la IL-10 tiene también propiedades inmunoestimuladoras: incrementa la producción de FR (152), aumenta la proliferación de mastocitos y la actividad citolítica de células NK, y es un potente factor capaz de causar proliferación y diferenciación de células B productoras

de anticuerpos (152, 153). La IL-10 empieza a expresarse en la fase tardía de la respuesta inmunitaria como respuesta inmunosupresora, el hecho de que esté sobre expresada en neutrófilos de pacientes con AR sugiere un intento de frenar la respuesta inmune y así reducir los daños asociados a la misma.

En cuanto a los polimorfismos asociados a las características clínicas se observó: el alelo C del SNP estudiado para el polimorfismo SLCO1B1 era más frecuente en individuos ACCP negativos, el alelo G del TNF- α rs361525 (G-238A) y el alelo T del PTPN22 se relacionaron con la ausencia y presencia de FR respectivamente, el alelo T del SLCO1B1 se asoció a un mayor grado de actividad de la enfermedad, el alelo C del polimorfismo rs2070874 C33T estudiado para la IL4 también se asoció a un mayor grado de actividad al igual que el alelo C del polimorfismo estudiado para la IL6.

Concretando en los resultados se observó que el alelo C del SNP estudiado para el SLCO1B1 estaba más representado en individuos con ACCP negativos. Este dato es difícil de interpretar ya que en principio la proteína que codifica este gen está implicada en procesos de internalización de productos al hepatocito. Juega un papel importante en el transporte de fármacos y es responsable de múltiples

interacciones y déficits metabólicos que pueden causar efectos adversos a los medicamentos.

Por otro lado el alelo G del polimorfismo estudiado para el TNF- α rs361525 (G-238A) se asocia a la ausencia de factor reumatoide (OR 0,7 (0,16-0,89) $p=0,044$). No se han encontrado estudios anteriores que relacionen ambos marcadores, pero se sabe que en pacientes con el alelo G se producen erosiones más severas relacionadas con cantidades más elevadas de TNF- α lo que en principio podría relacionarse con la presencia en mayores cantidades de factor reumatoide y no con la ausencia del mismo. En cualquier caso, el resultado está en el límite de la significación estadística con lo que es posible que este resultado se asocie más al azar que a una relación causal.

En cuanto al polimorfismo estudiado para el PTPN22 T vs C, el alelo T se asocia a la presencia de FR en nuestros pacientes (OR 2,4 (1,35-4,79) $p=0,012$). Este resultado se repite en otros estudios en los que también se relaciona con la incidencia de otras enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I, el lupus eritematoso sistémico o la tiroiditis autoinmune (154, 155). Hay que destacar que en un estudio llevado a cabo sobre 3 cohortes de pacientes caucásicos con AR se observó que este polimorfismo se asociaba al subgrupo

seropositivo pero no al grupo FR negativo (156) observándose además que son especialmente susceptibles los individuos homocigotos para este SNP. Además de lo que se ha comentado previamente (esta tirosina influye en el mínimo estímulo necesario para activar células T) actualmente se sabe que provoca defectos en las vías de señalización asociadas a proteínas TCR y BCR, observándose fallos en la señalización en linfocitos B lo que provoca que hayan menos linfocitos circulantes de memoria y se postula que puede derivar en fallos a nivel de tolerancia inmunológica lo que induciría la producción de auto-anticuerpos (157).

En cuanto al grado de actividad de la enfermedad medido a través del DAS28 se han identificado tres polimorfismos genéticos asociados a la misma. De nuevo el polimorfismo SLCO1B1 mostró diferencias estadísticamente significativas con un resultado difícil de interpretar. En este caso es el alelo T el que se asocia a mayor actividad de la enfermedad ya que se observa que individuos homocigotos para este alelo presentan mayor actividad frente a individuos homocigotos para el alelo C ($p=0,0153$). En nuestro estudio se ha hallado una asociación no descrita previamente entre la presencia del alelo T y la positividad para ACCP. La presencia de títulos elevados de ACCP se ha descrito en casos más graves de AR

especialmente en formas más erosivas de la enfermedad (158). La combinación de estos dos resultados hace pensar que este gen pueda estar implicado en el proceso patológico y no sólo en el metabolismo de fármacos, aunque por el momento no disponemos de estudios que respalden esta teoría.

En cuanto a la IL-4 parece que los individuos homocigotos para el alelo T presentan un mayor grado de actividad de la enfermedad que aquellos heterocigotos ($p=0,0202$) y que aquellos homocigotos para el alelo C ($p=0,0221$). El polimorfismo más estudiado en esta citoquina se encuentra en la región promotora del gen y se ha asociado a la incidencia de asma, alergia y diferentes tipos de cáncer (159, 160). En nuestro caso el polimorfismo que se ha asociado a una forma más activa de la enfermedad es el rs2070874 C33T.

Finalmente los individuos homocigotos para el alelo C del polimorfismo estudiado para la IL-6 presentaron también un mayor grado de actividad que los individuos heterocigotos ($p=0,0032$) y que aquellos que fueron homocigotos para el alelo G ($p=0,0021$). Este polimorfismo se ha asociado a la patología en población asiática aunque los resultados son controvertidos, ya que en población turca y europea se ha descartado su asociación a la patología (161, 162). Este

polimorfismo se encuentra relacionado con niveles plasmáticos elevados de IL-6 lo que permitiría explicar que los individuos portadores del polimorfismo menor expresen mayor cantidad de IL-6 y en consecuencia presenten una forma más grave de la patología. Actualmente esta citoquina es una diana en el tratamiento de la AR. Concretamente el anticuerpo monoclonal Tocilizumab (RoActemra®) actúa bloqueando la actividad de la misma y ha mostrado ser eficaz en la reducción de los signos y síntomas de la patología, además de ser eficaz en la mejora de la capacidad funcional de los pacientes. Con todo ello se puede concluir que el polimorfismo estudiado al suponer niveles más elevados de IL-6 es lógico que se asocie a formas más graves de la patología.

En cuanto a la respuesta a los fármacos, se observó que entre los pacientes no respondedores a MTX había una mayor proporción de pacientes fumadores respecto a los pacientes respondedores. El tabaco es el factor externo que con más fortaleza se ha asociado a la incidencia de AR, especialmente en pacientes ACCP positivos (18). En múltiples estudios se ha asociado también a la gravedad de la enfermedad (163, 164), aunque los resultados son controvertidos por el momento ya que se han observado incluso formas más leves de la patología en grandes fumadores en otros estudios (18). En cuanto a la

respuesta a los fármacos ya se ha descrito previamente que aquellos pacientes fumadores activos son peores respondedores a MTX (165, 166). El hábito tabáquico se ha asociado a la falta de respuesta a MTX de manera independiente a la presencia o ausencia de ACCP, lo que sugiere que el mecanismo por el cual contribuye a la aparición de la enfermedad difiere del que influye en la respuesta al fármaco (165). Aunque se desconoce porqué influye en la respuesta al fármaco se han propuesto varios factores como las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas. De hecho estudios recientes muestran que los individuos fumadores presentan menor concentración de MTX poliglutamato, que es la forma activa del fármaco en el interior de la célula, lo que indica que los fumadores metabolizan de forma distinta el fármaco (165, 167).

El alelo T del PTPN22 se asoció a una mayor respuesta a MTX en nuestros pacientes (OR 3,48 (1,86-9,47) $p= 0,016$). Los resultados publicados son contradictorios y el único estudio publicado por el momento que ha buscado exhaustivamente esta relación no consiguió obtener resultados estadísticamente significativos, aunque sí se observó una tendencia, viéndose que los individuos homocigotos para el alelo T eran 3 veces más numerosos en el grupo de respondedores (168). Este hallazgo respalda nuestro resultado y sería

interesante incrementar el tamaño muestral para consolidarlo y así poder describir un perfil genético de buenos respondedores a MTX.

En cuanto a los niveles de expresión en neutrófilos y la respuesta a MTX se observó que aquellos pacientes no respondedores expresaban mayores niveles de TNF- α que los pacientes respondedores. Los neutrófilos reclutados en las articulaciones inflamadas de los pacientes con AR producen de forma inducida por el contacto con las células endoteliales TNF- α , lo que implica que los neutrófilos además de ser fuente de proteínas citrulinadas producen de forma específica la citoquina central del proceso (68). Esta citoquina constituye un factor de gravedad de manera que los niveles elevados se asocian a formas más graves de la patología. Esto hace pensar que las formas más agresivas y por tanto que peor responden al tratamiento puedan presentar niveles más elevados de esta citoquina y una fuente importante de la misma podría constituirlos los neutrófilos que se encuentran en grandes cantidades en las articulaciones inflamadas.

Otra proteína que se encontró más expresada en neutrófilos de pacientes no respondedores respecto a pacientes respondedores a MTX fue STAT3. Varios estudios han mostrado que este transductor de señal tiene un papel fundamental en la movilización de neutrófilos

desde la médula en respuesta a citoquinas como el factor estimulador de colonias granulocíticas (169), lo que sugiere que la sobre expresión de esta proteína pueda relacionarse con la mayor migración hacia el foco inflamatorio como de hecho ocurre en la AR. El hecho de que haya una mayor cantidad de neutrófilos en el líquido sinovial puede relacionarse con formas más agresivas de la patología y por tanto con una menor respuesta al tratamiento.

En el siguiente subestudio se observó que el alelo C del rs11045879 (SLCO1B1) se encuentra más representado en individuos que desarrollaron toxicidad por MTX ($p=0,037$). Como ya se ha comentado este gen codifica una proteína transportadora responsable de la internalización del fármaco al hígado y por tanto de su metabolismo. Actualmente no existen resultados publicados que relacionen la presencia de este polimorfismo con la toxicidad asociada a MTX en pacientes con AR. Sin embargo hay varios estudios que muestran un aumento de efectos tóxicos en niños con leucemia linfobástica aguda tratados con éste fármaco (115, 170, 171). Nuestro resultado por tanto, de confirmarse con otros estudios, podría servir para identificar a aquellos pacientes que vayan a desarrollar reacciones adversas a MTX.

En cuanto a la respuesta al tratamiento con anti-TNF- α se observó que el alelo T del polimorfismo estudiado para el PTPN22 se asociaba a una mejor respuesta a los fármacos ($p=0,001$). Este polimorfismo se relaciona con formas más agresivas de la patología que en general presentan mayores niveles de TNF- α y por tanto un bloqueo del mismo será más efectivo en pacientes con este fenotipo de la patología.

6. Conclusiones:

- 1) Hemos identificado cuatro polimorfismos asociados a la AR de los cuales destacan por verse refrendados por la literatura y la teoría el alelo G del TNF α -238(G/A), el alelo C del Fc γ RIIIA; rs396991 C>A y el alelo T del SNP PTPN22_C1858T.
- 2) Se han identificado cuatro haplotipos asociados al riesgo de padecer la enfermedad. Concretamente el ACC de los genes TNF α G-238A, FCGR3A 559C>A y PTPN22 C1858T y el CC de los polimorfismos FCGR3A 559C>A e IL-6Rsol A358C parecen tener un papel protector frente a la enfermedad mientras que el AA de los SNPs MTHFR A1298C y FCGR3A 559C>A y el AG de los polimorfismos MTHFR A1298C y TNF α G-238^a parecen constituir un factor de riesgo.
- 3) Se han identificado 5 genes más expresados en neutrófilos de individuos enfermos que en sanos: FCGR3A, FCGR3B, JAK2, MMP-9 e IL-10.
- 4) Se ha observado que el alelo T del polimorfismo estudiado para el PTPN22 T vs C se asocia a la presencia de factor reumatoide.
- 5) Se ha observado un mayor grado de actividad de la enfermedad medida a través de la escala DAS28 en los pacientes portadores de los alelos T T y C en los polimorfismos SLCO1B1 C>T rs11045879, IL-4 rs2070874 C33T, IL-6 rs1800796 -572G>C respectivamente.

- 6) En nuestra población se asocia la falta de respuesta a MTX con el hábito tabáquico y a la sobre expresión de TNF α y STAT3.
- 7) El alelo C del rs11045879 SLCO1B1 se encuentra más representado en pacientes que desarrollan toxicidad a MTX en nuestra población.
- 8) Por último se ha descrito que el alelo T del PTPN22 C1858T se asocia con una mayor respuesta a MTX y a los fármacos anti-TNF α .

7. Referencias bibliográficas:

1. Lorenzo M. Rheumatoid arthritis. *Foot Ankle Clin.* 2007 Sep;12(3):525-37, vii.
2. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics.* 2011 Aug;63(8):459-66.
3. Colmegna I, Ohata BR, Menard HA. Current understanding of rheumatoid arthritis therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Apr;91(4):607-20.
4. Farheen K, Agarwal SK. Assessment of disease activity and treatment outcomes in rheumatoid arthritis. *J Manag Care Pharm.* 2011 Nov-Dec;17(9 Suppl B):S09-13.
5. Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Res Ther.* 2009;11 Suppl 1:S1.
6. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R949-58.
7. Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, Redlich K, Steiner G, Wagner O. The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now? *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):208.
8. Blanco FJ, Ballina J, Carbonell J, Martin-Mola E, Tornero J, Ramirez E, et al. [Descriptive study of the use of DMARD in patients with rheumatoid arthritis or persistent arthritis who start drug treatment in Spain (FIRST)]. *Reumatol Clin.* 2011 Mar-Apr;7(2):88-93.
9. Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MA, Carmona L. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford).* 2008 Jul;47(7):1088-92.
10. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 2005 Oct;12(3):153-65.
11. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Aug;6(8):468-76.

12. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010 Dec;24(6):733-45.
13. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Jan;41(1):88-95.
14. Klareskog L, Padyukov L, Lorentzen J, Alfredsson L. Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Aug;2(8):425-33.
15. Lahiri M, Morgan C, Symmons DP, Bruce IN. Modifiable risk factors for RA: prevention, better than cure? *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Mar;51(3):499-512.
16. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar;70(3):508-11.
17. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 May;21(3):279-83.
18. Finckh A, Dehler S, Costenbader KH, Gabay C. Cigarette smoking and radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1066-71.
19. Baka Z, Buzas E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):238.
20. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008 Oct;67(10):1488-92.
21. Laragione T, Shah A, Gulko PS. The vitamin D receptor regulates rheumatoid arthritis synovial fibroblast invasion and morphology. *Mol Med*. 2012;18(1):194-200.
22. Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. *Mod Rheumatol*. 2009;19(5):453-6.

23. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):218.
24. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2662-72.
25. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):30-7.
26. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jul;51 Suppl 5:v3-11.
27. 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 Oct;40(10):1216-23.
28. Eleftherohorinou H, Hoggart CJ, Wright VJ, Levin M, Coin LJ. Pathway-driven gene stability selection of two rheumatoid arthritis GWAS identifies and validates new susceptibility genes in receptor mediated signalling pathways. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1;20(17):3494-506.
29. van der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE, Huizinga TW, Thomson W, Worthington J, et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 Apr;60(4):916-23.
30. Banal F, Dougados M, Combescure C, Gossec L. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Jul;68(7):1184-91.
31. 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 Mar;31(3):315-24.

32. Morel J, Combe B. How to predict prognosis in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005 Feb;19(1):137-46.
33. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2569-81.
34. Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LG, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):638-41.
35. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med*. 2002 Nov;60(10):383-8.
36. van Venrooij WJ, Vossenaar ER, Zendman AJ. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2004 Jun;3 Suppl 1:S17-9.
37. Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev*. 2011 Dec;11(2):123-31.
38. Garcia-Patos V. Rheumatoid nodule. *Semin Cutan Med Surg*. 2007 Jun;26(2):100-7.
39. Bartels CM, Bridges AJ. Rheumatoid vasculitis: vanishing menace or target for new treatments? *Curr Rheumatol Rep*. 2010 Dec;12(6):414-9.
40. Fujita M, Igarashi T, Kurai T, Sakane M, Yoshino S, Takahashi H. Correlation between dry eye and rheumatoid arthritis activity. *Am J Ophthalmol*. 2005 Nov;140(5):808-13.
41. Rojas-Serrano J, Gonzalez-Velasquez E, Mejia M, Sanchez-Rodriguez A, Carrillo G. Interstitial lung disease related to rheumatoid arthritis: evolution after treatment. *Reumatol Clin*. 2012 Mar-Apr;8(2):68-71.
42. Kim EJ, Collard HR, King TE, Jr. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: the relevance of

histopathologic and radiographic pattern. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1397-405.

43. Kaplan MJ. Cardiovascular complications of rheumatoid arthritis: assessment, prevention, and treatment. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010 May;36(2):405-26.

44. Villa-Forte A, Mandell BF. [Cardiovascular disorders and rheumatic disease]. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Sep;64(9):809-17.

45. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003 Dec 16;108(24):2957-63.

46. Sanchez-Ramon S, Lopez-Longo FJ, Carreno L. [Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]. *Reumatol Clin*. 2011 Mar;6S3:S20-4.

47. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001 Mar 22;344(12):907-16.

48. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010 Jan;233(1):233-55.

49. Karmakar S, Kay J, Gravalles EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010 May;36(2):385-404.

50. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010 May;36(2):271-96.

51. Stephenson JL, Shipman AR. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics criteria have replaced the American College of Rheumatology guidelines for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2014 Apr;39(3):431-2.

52. Ward MM. Update on the American College of Rheumatology/Spondyloarthritis Research and Treatment Network/Spondylitis Association of America axial spondyloarthritis treatment guidelines project. *Clin Rheumatol*. 2014 May 10.

53. Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. *Arthritis Rheum.* 1999 Sep;42(9):1785-96.
54. Buckley LM. Importance of guidelines on glucocorticoid-induced osteoporosis: comment on the American College of Rheumatology Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Rheum.* 1997 Aug;40(8):1547.
55. Kitamura CR, Rohekar G, Bykerk VP, Carette S. Are the 2002 American College of Rheumatology guidelines for the management of rheumatoid arthritis being followed in Canada's largest academic rheumatology center? *J Rheumatol.* 2007 Nov;34(11):2183-92.
56. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guidelines. *Arthritis Rheum.* 1996 May;39(5):713-22.
57. Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR, et al. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part I. Osteoarthritis of the hip. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum.* 1995 Nov;38(11):1535-40.
58. Liang MH. The American College of Rheumatology practice guidelines strategy. *Arthritis Care Res.* 1995 Sep;8(3):132-3.
59. Pablos JL. Aspirin antiplatelet therapy and nonsteroidal antiinflammatory drugs: comment on the 2002 update of the American College of Rheumatology Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Nov;46(11):3102.
60. Gatter RA, Andrews RP, Cooley DA, Fiechtner JJ, Minna DA, Phelps P, et al. American college of rheumatology guidelines for performing office synovial fluid examinations. *J Clin Rheumatol.* 1995 Jun;1(3):194-6.
61. White B, Bauer EA, Goldsmith LA, Hochberg MC, Katz LM, Korn JH, et al. Guidelines for clinical trials in systemic sclerosis (scleroderma). I. Disease-modifying interventions. The American College of Rheumatology Committee on Design and

Outcomes in Clinical Trials in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1995 Mar;38(3):351-60.

62. van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis may require a concerted action of Th2 cytokines. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002 Jul;3(7):1011-6.

63. Nuki G. An appraisal of the 2012 American College of Rheumatology Guidelines for the Management of Gout. *Curr Opin Rheumatol.* 2014 Mar;26(2):152-61.

64. Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh MK, Neogi T, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 Oct;64(10):1431-46.

65. Boers M, Kirwan JR, Bijlsma JW. American College of Rheumatology treatment guidelines continue to omit guidance on glucocorticoids: comment on the article by Singh et al. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 Oct;64(10):1622.

66. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Sep;49(9):1618-31.

67. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Oct;10(10):593-601.

68. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev.* 2010 Jun;9(8):531-5.

69. Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol.* 2007 Nov;34(11):2162-70.

70. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jun;152(3):415-22.

71. van der Linden MP, Feitsma AL, le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint

destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2242-7.

72. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jun;69(6):964-75.

73. Blanco-Morales EA, Bravo-Ferrer Acosta JM, Rubio Romero E, Gil Gonzalez E, Gantes Pedraza MA. [Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: almost always or hardly ever?]. *Reumatol Clin.* 2011 Nov-Dec;7(6):407-11.

74. Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 2004 Nov;50(11):3408-17.

75. Borchers AT, Keen CL, Cheema GS, Gershwin ME. The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2004 Aug;34(1):465-83.

76. Singh JA, 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 antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 May;64(5):625-39.

77. Davila L, Ranganathan P. Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Sep;7(9):537-50.

78. 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 Rheum.* 2008 Jun 15;59(6):762-84.

79. Tornero Molina J, Sanmarti Sala R, Rodriguez Valverde V, Martin Mola E, Marengo de la Fuente JL, Gonzalez Alvaro I, et al. [Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin.* 2010 Jan-Feb;6(1):23-36.

80. Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Judovitch R, Caspi D, Yaron M. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin

1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann Rheum Dis*. 2003 May;62(5):440-3.

81. van Riel PL, Smolen JS, Emery P, Kalden JR, Dougados M, Strand CV, et al. Leflunomide: a manageable safety profile. *J Rheumatol Suppl*. 2004 Jun;71:21-4.

82. Rodenburg RJ, Ganga A, van Lent PL, van de Putte LB, van Venrooij WJ. The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alpha expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):1941-50.

83. van der Heijden J, de Jong MC, Dijkmans BA, Lems WF, Oerlemans R, Kathmann I, et al. Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNFalpha. *Ann Rheum Dis*. 2004 Feb;63(2):138-43.

84. Genta MS, Kardes H, Gabay C. Clinical evaluation of a cohort of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha in the community. *Joint Bone Spine*. 2006 Jan;73(1):51-6.

85. van der Heijde D, Klareskog L, Rodriguez-Valverde V, Codreanu C, Bolosiu H, Melo-Gomes J, et al. Comparison of etanercept and methotrexate, alone and combined, in the treatment of rheumatoid arthritis: two-year clinical and radiographic results from the TEMPO study, a double-blind, randomized trial. *Arthritis Rheum*. 2006 Apr;54(4):1063-74.

86. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst D, Weisman MH, et al. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1051-65.

87. Brocq O, Roux CH, Albert C, Breuil V, Aknouche N, Ruitord S, et al. TNFalpha antagonist continuation rates in 442 patients with inflammatory joint disease. *Joint Bone Spine*. 2007 Mar;74(2):148-54.

88. Chaves Chaparro LM, Salvatierra Ossorio J, Raya Alvarez E. [Predictors of response to biologic therapies in rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin*. 2011 Mar-Apr;7(2):141-4.

89. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):2766-74.
90. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2525-30.
91. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics.* 2002 Apr;12(3):183-90.
92. Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol.* 2009 Mar;36(3):539-45.
93. Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):607-12.
94. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2003 May;11(5):593-600.
95. Wessels JA, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2830-9.

96. O'Rielly DD, Rahman P. Pharmacogenetics of rheumatoid arthritis: Potential targets from susceptibility genes and present therapies. *Pharmgenomics Pers Med*. 2010;3:15-31.
97. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun*. 2004 Aug;5(5):315-29.
98. Mourao AF, Caetano-Lopes J, Costa P, Canhao H, Santos MJ, Pinto P, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 genotypes influence inflammatory activity and TNF-alpha serum concentrations in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2009 Apr;36(4):837-42.
99. Oregon-Romero E, Vazquez-Del Mercado M, Ruiz-Quezada SL, Navarro-Hernandez RE, Rangel-Villalobos H, Martinez-Bonilla G, et al. Tumor necrosis factor alpha-308 and -238 polymorphisms in rheumatoid arthritis. Association with messenger RNA expression and sTNF-alpha. *J Investig Med*. 2008 Oct;56(7):937-43.
100. Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Wang S, Li G, Gao J, et al. Association between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter -308 G/A and response to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2013 May;23(3):489-95.
101. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, et al. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum*. 2001 Dec;44(12):2819-27.
102. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):1059-70.
103. Kastbom A, Ahmadi A, Soderkvist P, Skogh T. The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Oct;44(10):1294-8.
104. Morgan AW, Keyte VH, Babbage SJ, Robinson JJ, Ponchel F, Barrett JH, et al. Fc gamma RIIIa-158V and

rheumatoid arthritis: a confirmation study. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Apr;42(4):528-33.

105. Radstake TR, Petit E, Pierlot C, van de Putte LB, Cornelis F, Barrera P. Role of Fcγ receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003 May;30(5):926-33.

106. Louis E, El Ghouli Z, Vermeire S, Dall'Ozzo S, Rutgeerts P, Paintaud G, et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Mar 1;19(5):511-9.

107. Seitz M, Wirthmuller U, Moller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-α gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFα-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Jan;46(1):93-6.

108. Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, Pacheco D, et al. Tumour necrosis factor (TNF)α -308 G/G promoter polymorphism and TNFα levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2006 Nov-Dec;35(6):435-40.

109. Lee YH, Ji JD, Bae SC, Song GG. Associations between tumor necrosis factor-α (TNF-α) -308 and -238 G/A polymorphisms and shared epitope status and responsiveness to TNF-α blockers in rheumatoid arthritis: a metaanalysis update. *J Rheumatol*. 2010 Apr;37(4):740-6.

110. Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor-α receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002 Sep;29(9):1847-50.

111. 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. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Apr;19(4):319-23.

112. Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, et al. Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet.* 2013 Mar;9(3):e1003394.
113. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. 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 Criteria. *Arthritis Rheum.* 1996 Jan;39(1):34-40.
114. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis.* 2004 Oct;63(10):1227-31.
115. 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 Dec 10;27(35):5972-8.
116. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med.* 1993 Feb 1;177(2):557-60.
117. Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999 Nov;58 Suppl 1:I20-6.
118. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, et al. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol.* 1997 May;36(5):516-21.
119. Kuo NW, Lympny PA, Menezo V, Lagan AL, John S, Yeo TK, et al. TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 May;46(5):1565-71.

120. Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, et al. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):351-5.
121. Balsa A, Del Amo J, Blanco F, Caliz R, Silva L, Sanmarti R, et al. Prediction of functional impairment and remission in rheumatoid arthritis patients by biochemical variables and genetic polymorphisms. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Mar;49(3):458-66.
122. OMIM. <http://www.omim.org>. 2012 [10/01/2013].
123. Lamana A, Balsa A, Rueda B, Ortiz AM, Nuno L, Miranda-Carus ME, et al. The TT genotype of the STAT4 rs7574865 polymorphism is associated with high disease activity and disability in patients with early arthritis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43661.
124. Jiang Y, Zhang R, Zheng J, Liu P, Tang G, Lv H, et al. Meta-analysis of 125 rheumatoid arthritis-related single nucleotide polymorphisms studied in the past two decades. *PLoS One*. 2012;7(12):e51571.
125. Rodriguez-Rodriguez L, Lamas JR, Varade J, Lopez-Romero P, Tornero-Esteban P, Abasolo L, et al. Plasma soluble IL-6 receptor concentration in rheumatoid arthritis: associations with the rs8192284 IL6R polymorphism and with disease activity. *Rheumatol Int*. 2011 Mar;31(3):409-13.
126. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*. 1992 Mar;41(3):557-9.
127. Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, Furihata S, Kamitsuji S, Inoue E, et al. Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Jun;17(6):383-90.
128. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Oct;54(10):3095-103.

129. Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, Schwab M, Ahmad T, Jewell DP. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Oct;15(10):705-11.
130. Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, et al. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1765-75.
131. Tasbas O, Borman P, Gurhan Karabulut H, Tukun A, Yorgancioglu R. The Frequency of A1298C and C677T Polymorphisms of the Methylentetrahydrofolate Gene in Turkish Patients with Rheumatoid Arthritis: Relationship with Methotrexate Toxicity. *Open Rheumatol J*. 2011;5:30-5.
132. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B, et al. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R71.
133. Llanos C, Soto L, Sabugo F, Bastias MJ, Salazar L, Aguillon JC, et al. [The influence of -238 and -308 TNF alpha polymorphisms on the pathogenesis and response to treatment in rheumatoid arthritis]. *Rev Med Chil*. 2005 Sep;133(9):1089-95.
134. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997 Feb;72(2):149-53.
135. Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, et al. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet*. 1999 Aug;8(8):1443-9.
136. Nandakumar KS, Holmdahl R. Collagen antibody induced arthritis. *Methods Mol Med*. 2007;136:215-23.
137. Thabet MM, Huizinga TW, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, et al. Contribution of Fcgamma receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy

- number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Nov;68(11):1775-80.
138. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol*. 2008 Nov;35(11):2129-35.
139. Stanford SM, Bottini N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Oct;10(10):602-11.
140. Marinou I, Walters K, Winfield J, Bax DE, Wilson AG. A gain of function polymorphism in the interleukin 6 receptor influences RA susceptibility. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):1191-4.
141. Chen JY, Wang CM, Chang SW, Cheng CH, Wu YJ, Lin JC, et al. Association of FCGR3A and FCGR3B copy number variations with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in Taiwanese patients. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Nov;66(11):3113-21.
142. Robinson JI, Carr IM, Cooper DL, Rashid LH, Martin SG, Emery P, et al. Confirmation of association of FCGR3B but not FCGR3A copy number with susceptibility to autoantibody positive rheumatoid arthritis. *Hum Mutat*. 2012 Apr;33(4):741-9.
143. Mamtani M, Anaya JM, He W, Ahuja SK. Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2010 Mar;11(2):155-60.
144. Cooper DL, Martin SG, Robinson JI, Mackie SL, Charles CJ, Nam J, et al. FcγRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One*. 2012;7(1):e28918.
145. Meyer SC, Levine RL. Molecular pathways: molecular basis for sensitivity and resistance to JAK kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2014 Apr 15;20(8):2051-9.
146. Cutolo M, Meroni M. Clinical utility of the oral JAK inhibitor tofacitinib in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Inflamm Res*. 2013 Nov 15;6:129-37.

147. Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol*. 2006 Jul;26(4):299-307.
148. Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996 Sep;39(9):1576-87.
149. Chang YH, Lin IL, Tsay GJ, Yang SC, Yang TP, Ho KT, et al. Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem*. 2008 Aug;41(12):955-9.
150. Grillet B, Dequeker J, Paemen L, Van Damme B, Opdenakker G. Gelatinase B in chronic synovitis: immunolocalization with a monoclonal antibody. *Br J Rheumatol*. 1997 Jul;36(7):744-7.
151. Keystone E, Wherry J, Grint P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998 Aug;24(3):629-39.
152. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):96-104.
153. Oral HB, Kotenko SV, Yilmaz M, Mani O, Zumkehr J, Blaser K, et al. Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Eur J Immunol*. 2006 Feb;36(2):380-8.
154. Ates A, Karaaslan Y, Karatayli E, Ertugrul E, Aksaray S, Turkyilmaz A, et al. Association of the PTPN22 gene polymorphism with autoantibody positivity in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens*. 2011 Jul;78(1):56-9.
155. Pierer M, Kaltenhauser S, Arnold S, Wahle M, Baerwald C, Hantzschel H, et al. Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R75.
156. Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-

- dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.* 2005 Mar;6(2):129-33.
157. Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J Immunol.* 2007 Oct 1;179(7):4704-10.
158. Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003 May;62(5):427-30.
159. Luo Y, Ye Z, Li K, Chen R, Li S, Pang J. Associations between polymorphisms in the IL-4 and IL-4 receptor genes and urinary carcinomas: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):1227-33.
160. Zhu N, Gong Y, Chen XD, Zhang J, Long F, He J, et al. Association between the polymorphisms of interleukin-4, the interleukin-4 receptor gene and asthma. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(15):2943-51.
161. Arman A, Coker A, Sarioz O, Inanc N, Direskeneli H. Lack of association between IL-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population. *Rheumatol Int.* 2012 Jul;32(7):2199-201.
162. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between interleukin-6 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2012 Jul;61(7):665-71.
163. Matthey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, et al. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum.* 2002 Mar;46(3):640-6.
164. Mikuls TR, Hughes LB, Westfall AO, Holers VM, Parrish L, van der Heijde D, et al. Cigarette smoking, disease severity and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov;67(11):1529-34.
165. Saevarsdottir S, Wedren 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 Register cohorts. *Arthritis Rheum.* 2011 Jan;63(1):26-36.

166. Saevarsdottir S, Wallin H, Seddighzadeh M, Ernestam S, Geborek P, Petersson IF, et al. Predictors of response to methotrexate in early DMARD naive rheumatoid arthritis: results from the initial open-label phase of the SWEFOT trial. *Ann Rheum Dis.* 2011 Mar;70(3):469-75.

167. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2248-56.

168. Majorczyk E, Pawlik A, Kusnierczyk P. PTPN22 1858C>T polymorphism is strongly associated with rheumatoid arthritis but not with a response to methotrexate therapy. *Int Immunopharmacol.* 2010 Dec;10(12):1626-9.

169. Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood.* 2010 Apr 22;115(16):3354-63.

170. Yang JJ, Cheng C, Yang W, Pei D, Cao X, Fan Y, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA.* 2009 Jan 28;301(4):393-403.

171. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Pinan MA, Garcia-Miguel P, Navajas A, et al. Polymorphisms of the SLC01B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Oct;57(4):612-9.

***ANEXO I: Hoja de información al
paciente.***

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

“Estudio farmacogenómico de la artritis reumatoide”.

Estimado/a Sr./Sra:

Le proponemos participar en un estudio de investigación sobre la influencia de la carga genética sobre la respuesta al tratamiento de la artritis reumatoide. Se ha demostrado que existen diferencias interindividuales en los genes que regulan la respuesta farmacológica de los principales fármacos utilizados en la artritis reumatoide. En particular variaciones de los genes MTHFR, SLCO1B1, TNF α , IL-10, IL1RN, TGF β 1, TNFR2, FCGR3A, FCGR2A, STAT4, PTPN22 e IL-6 se han relacionado recientemente con la respuesta y/o toxicidad al tratamiento de la artritis reumatoide con lo que parece que en un futuro se podría predecir la respuesta al tratamiento antes de su aplicación.

El objeto de este estudio es la validación de estos marcadores genéticos como predictores de la respuesta al tratamiento de la artritis reumatoide. Dicho estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). El presente estudio no modificará su tratamiento habitual, recibiendo usted el tratamiento óptimo que estime oportuno su médico según práctica clínica habitual, así como el seguimiento clínico oportuno. El día 1 de visita, se le extraerá por venopunción en la vena del brazo, 10 ml de sangre para realizarle el análisis genético correspondiente. Dicha extracción no presenta riesgo alguno ni molestia salvo la derivada de la punción. Además dicha extracción de sangre coincidirá con la extracción realizada en la práctica clínica habitual no requiriéndose por tanto extracción de sangre adicional. Dicha muestra se conservará en congelador a -80°C etiquetada con un número identificativo siendo por lo tanto anónima. La muestra de sangre tendrá un acceso restringido a los investigadores del estudio y únicamente se utilizará con los fines y propósitos objeto de estudio. Esta se almacenará durante 4 años, siendo posteriormente destruida. Si en algún momento la muestra sufriera algún deterioro, sería destruida informándole inmediatamente de tal acción. En caso de solicitar la destrucción de la muestra, usted no tendría que dar explicaciones de su decisión, procediendo a la inmediata destrucción de la misma. En caso de que usted desee conocer los resultados de sus marcadores genéticos y la interpretación de los mismos, puede contactar con la persona abajo citada una vez se conozcan los resultados para beneficiarse si fuera el caso de los mismos.

Usted tiene derecho a no conocer los resultados de su polimorfismo genético ni las posibles consecuencias y beneficios que de él se deriven. Si surgiera algún problema o tuviera alguna pregunta que formular acerca

de este estudio, respecto de sus derechos como participante en una investigación clínica, póngase en contacto con:

Dr.....Teléfono:.....

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y por tanto carece de cualquier compensación económica. Tanto si participa en el estudio como si no participa en él, y como si participando en el estudio decide retirarse en cualquier momento y por cualquier razón, su médico le tratará con el mismo nivel de cuidados. Tanto el investigador principal como los otros investigadores se comprometen a mantener la confidencialidad de sus datos, y velar porque se cumpla en todo momento con lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

ANEXO II: Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Estudio farmacogenómico de la artritis reumatoide”.

Yo, (nombre y apellidos).....
He leído la hoja de información que se me ha entregado
He podido hacer preguntas sobre el estudio
He recibido suficiente información sobre el estudio
He hablado con (nombre y apellidos del investigador).....
Comprendo que mi participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:
-cuando quiera
-sin tener que dar explicaciones
-sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante
Firma del investigador

Fecha
Fecha

(Cuando proceda, p. ej., en menores y en sujetos con demencia grave, incluir el nombre en mayúsculas y la firma del representante legal del sujeto)

MODELO DE CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE

Título del ensayo: “Estudio farmacogenómico de la artritis reumatoide”.

Yo, (nombre y apellidos del representante, en mayúscula y escrito de su puño y letra) _____

_____ en calidad de (relación con el participante)

He recibido la hoja de información sobre el estudio
He podido hacer preguntas sobre el estudio
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
He recibido suficiente información sobre el estudio
He hablado con (nombre y apellidos del investigador, en mayúscula y escrito de su puño y letra) _____
Comprendo que la participación es voluntaria

Comprende que puede retirarse del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

En mi presencia se ha dado a (nombre y apellidos del participante en mayúsculas) _____ toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Y presto mi conformidad con que (nombre y apellidos del participante en mayúsculas) _____ participe en este estudio.

REPRESENTANTE LEGAL (Firma y fecha de su puño y letra.)

Firma del representante legal

Fecha

INVESTIGADOR (El investigador, o las persona designada por él para realizar el proceso de consentimiento informado, debe firmar y fechar el impreso al mismo tiempo que el sujeto.)

Firma de la persona que explica el consentimiento: Fecha

(Si el sujeto o el representante legal de sujeto no saben leer, es necesaria la firma de un testigo imparcial) y en este caso se firmaría el siguiente modelo

MODELO DE CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGO
(independiente del equipo investigador)

Título del estudio: “Estudio farmacogenómico de la artritis reumatoide”.

Yo, (nombre y apellidos del testigo, en mayúscula y escrito de su puño y letra) _____ declaro bajo mi responsabilidad que (nombre y apellidos del participante en mayúsculas)

Ha recibido la hoja de información sobre el estudio
Ha podido hacer preguntas sobre el estudio
Ha recibido suficiente información sobre el estudio
Ha sido informado por (nombre y apellidos del investigador, en mayúscula y escrito de su puño y letra): _____
Comprende que su participación es voluntaria
Comprende que puede retirarse del estudio:
1º- Cuando quiera
2º- Sin tener que dar explicaciones
3º- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio

TESTIGO IMPARCIAL (Firma y fecha de su puño y letra.)

Firma del testigo

Fecha

INVESTIGADOR (El investigador, o las persona designada por él para realizar el proceso de consentimiento informado, debe firmar y fechar el impreso al mismo tiempo que el sujeto.)

Firma de la persona que explica el consentimiento

Fecha

***ANEXO III: Aprobación del proyecto de
investigación.***

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 17 de Febrero de 2011 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Estudio farmacogenómico de la artritis reumatoide."		
I.P.:	Dr. Javier Milara Payá	Servicio/Unidad	Fundación Investigación

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado a la Convocatoria Consellería Sanidad 2011(Anexo IV) reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente
Presidente	Dr. Severiano Marin	X
Vocales	D. Ernesto Bataller	X
	D. Alejandro Moner	
	D. Germán García	
	Dr. D. José Manuel Irazo	
	Dr. D. Miguel Armengot	
	Dr. D. Julio Cortijo	
	Dra. Dña. Elena Rubio	
	Dr. D. Gustavo Juan	X
	Dra. Pilar Blasco	
	Dña. M ^a Teresa Jareño	X
	Dra. M ^a José Safont	X
	Dr. José Luis Fayos	X
	Dr. Agustín Herrera	
	Dra. Ana Blasco	
	Dr. Antonio Martorell	
	Dr. Aurelio Quesada	X
	Dr. Guillermo Sáez	X
Dr. Fco. Javier Cervera	X	
Dr. José Vte. Roig Vila	X	

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Dr. Rafael Poveda	
	Dra. Inmaculada Sáez	X
	Dr. Alberto Berenguer	X
	Dra. Amparo Perez	
	Dña. Encarna Domingo	X
	Dra. Paloma Escobar	
	Dña. M ^a Dolores Navarro	
	Dra. Lucia Ciancotti	
Secretario	Dra. Ana Mínguez	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente
CEIC)

