

Tesis doctoral

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE MICRORNAS EN SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TERAPIA BLOQUEADORA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

Tesis doctoral presentada por María del Carmen Castro Villegas,

Licenciada en Medicina y Cirugía, por la que opta al grado de Doctor en Medicina

Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. Rosario López Pedrera

Prof Dr. Eduardo Collantes Estévez



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**TITULO: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE MICRORNAS
EN SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TERAPIA BLOQUEADORA
DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA**

AUTOR: *María del Carmen Castro Villegas*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Hospital Universitario Reina Sofía

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE MICRORNAS EN SUERO DE
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
TERAPIA BLOQUEADORA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA**

Memoria presentada por:

Maria del Carmen Castro Villegas

Licenciada en Medicina y Cirugía, para optar al grado de Doctor.

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de la Dra. Rosario López Pedrera y el Prof.

Dr. Eduardo Collantes Estevez en el instituto Maimonides de Investigación
Biomédica de Córdoba (IMIBIC)

Programa doctorado de Biomedicina.

La doctoranda

Maria del Carmen Castro Villegas

Los directores de la tesis

Dra. Rosario López Pedrera

Prof. Dr. Eduardo Collantes Estevez



TÍTULO DE LA TESIS: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE MICRORNAS EN SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TERAPIA BLOQUEADORA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

DOCTORANDO/A: M^ª DEL CARMEN CASTRO VILLEGAS

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. M^ª del Carmen Castro Villegas presenta un trabajo original en el que se ha evaluado el efecto *in vivo* del tratamiento con fármacos anti-TNF α sobre el perfil de expresión de microRNAs en el suero de pacientes con Artritis Reumatoide, así como la posible asociación entre la expresión alterada de dichos microRNAs y los cambios operados en diversos parámetros clínicos y serológicos asociados a la respuesta a terapia. Se ha analizado asimismo el posible papel de dichos miRNAs como biomarcadores de respuesta al tratamiento.

Los resultados obtenidos de este trabajo han sido publicados en *Arthritis Research and Therapy*, revista científica de reconocido prestigio internacional en el campo de la investigación de la Reumatología.

La Tesis doctoral presentada se enmarca dentro de dos proyectos de investigación, financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI12/01511) y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-7940) de la Junta de Andalucía.

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 29 de Marzo de 2016

Firma del/de los director/es

Eduardo Collantes Estevez

Fdo.: _____

Rosario López Pedrera

Fdo.: _____

***“VIVE COMO SI FUERAS A MORIR MAÑANA,
APRENDE COMO SI FUERAS A VIVIR SIEMPRE”
(M.GANDHI)***

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de alguna forma en que la consecución de esta tesis doctoral haya sido posible.

A mis directores:

Al Dr. Collantes, porque sin su apoyo constante en las buenas y en las malas, su confianza en mí y su optimismo, yo no sería hoy lo que soy, como médico y como persona. Es un ejemplo a seguir, un trabajador incansable, entusiasta en todo lo que hace y siempre con una palabra de ánimo y una mirada cómplice y tranquilizadora. Como jefe, el mejor, brillante, conciliador, firme cuando las circunstancias lo requieren y dándolo todo por su gente. Gracias por permitirme formar parte de esta gran familia y por creer siempre en el buen fin de este trabajo.

A la Dr. López Pedrera, porque es el alma de este trabajo y porque sin su ayuda nunca habría podido realizar esta tesis doctoral. Investigadora nata, brillante, inteligente, responsable y, sobre todo, dulce y humilde. Una persona envidiable, por su calidad profesional y humana. Gracias por estar a mi lado y por tu dedicación y entrega y, por supuesto, por tu cariño. Ojala yo alguna vez pueda tener aunque sea la mitad de tu capacidad de síntesis y tu claridad de ideas.

A todo el equipo de la unidad GC-05 de Enfermedades autoinmunes sistémicas-inflamatorias crónicas del aparato locomotor y tejido conectivo del IBIMIC, especialmente a Carlos que es el artífice de este trabajo de investigación, también a Yolanda, Patricia, Nuria y M. Carmen. Sois un equipo envidiable, siempre dispuestos a ayudarnos en todo lo que necesitamos, sin peros, sin horarios... gracias. A Pilar, por todo el asesoramiento estadístico y por tu contribución tan importante en el análisis de los resultados, siempre dispuesta, en cualquier momento, en cualquier lugar. Gracias.

A mis compañeros, ante todo amigos, del servicio de Reumatología, por la paciencia que teneís conmigo, por vuestro apoyo incondicional y por haber estado a mi lado en los malos momentos. Sois mi referente y la ilusión y el ánimo para ir a trabajar todos los días. A Miguel Angel le quiero decir que aunque, no salió la primera

tesis, no olvido que fuiste mi primer director, y que yo siempre seré tu pequeño saltamontes.

Y, como no, a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, que me soportan día a día, que no me sueltan de la mano, que se alegran de mis logros y que han sufrido conmigo, posiblemente más que yo misma. Posiblemente la palabra gracias se queda pequeña, sois la mejor familia del mundo y yo no sería nada sin vuestro sacrificio y vuestro apoyo incondicional.

Quiero agradecer también el apoyo de esa otra familia que aunque no es de sangre, siempre está ahí, para lo bueno y para lo malo, en las duras y en las maduras... a Gloria, a Jimena, a Ana y a Loles.

Resumen

Cambios en la expresión de los niveles de microRNAs en suero de pacientes con artritis reumatoide en respuesta al tratamiento con terapia bloqueadora del factor de necrosis tumoral alfa

Introducción: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por sinovitis y destrucción progresiva del cartílago articular y hueso subyacente, junto con diversas manifestaciones extraarticulares. La alteración característica de la AR es una sinovitis inflamatoria persistente o sinovitis crónica. Aunque su curso es variable, suele conllevar a medio-largo plazo incapacidad funcional e invalidez. Puede afectar también otros órganos o sistemas, induciendo inflamación y fibrosis, arteriosclerosis precoz o manifestaciones sistémicas, como astenia marcada, anemia y osteoporosis, causa importante de comorbilidad y mortalidad en estos pacientes. Se trata de una patología crónica, de modo que muchos pacientes deben seguir tratamiento durante largos periodos de tiempo, lo que conlleva no sólo posibles efectos indeseables para el paciente, sino un coste económico elevado. El empleo de terapias biológicas, como los antiTNF- α , en el tratamiento de la AR, ha supuesto un gran avance terapéutico.

La respuesta a los tratamientos biológicos es muy variable, y, hasta la fecha, las características clínicas o analíticas de los pacientes no son suficientes para conocer de antemano la respuesta a un tratamiento concreto. En este sentido es importante encontrar factores clínicos, serológicos, genómicos... que nos ayuden a un diagnóstico temprano de la enfermedad y que puedan predecir la respuesta de un paciente a las distintas terapias. A estos factores se les denomina biomarcadores. Una de las características deseables de un biomarcador debería ser su facilidad de obtención, con técnicas poco invasivas para el paciente, tales como muestras de orina, saliva o suero.

En los últimos años, la epigenética se ha perfilado como una herramienta de gran utilidad en la búsqueda de nuevos biomarcadores. La epigenética abarca el estudio de aquellos mecanismos reguladores de la expresión génica que no implican cambios en la secuencia de DNA, y juega un papel fundamental en la regulación del genoma en respuesta a factores internos o ambientales. Los microRNAs han sido estudiados en distintas enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, artritis reumatoide, etc.), tanto en tejidos como en suero y otros fluidos, como el líquido sinovial, encontrándose, al igual que en otras patologías, que los niveles de distintos miRNAs difieren con respecto a sujetos sin la enfermedad. En la actualidad la búsqueda de miRNAs como posibles biomarcadores está haciendo proliferar estudios que intentan relacionarlos con

distintos factores clínicos y serológicos, tales como la VSG, los ACCP, el DAS28, etc (4). No obstante, son escasos los estudios publicados hasta la fecha que analicen la expresión de miRNAs específicos como predictores de respuesta a tratamiento con anti-TNF- α en enfermedades autoinmunes.

Por tanto, el objetivo principal del presente estudio es evaluar el efecto in vivo del tratamiento con fármacos antiTNF- α sobre el perfil de expresión de microRNAs en el suero de pacientes con AR, así como la posible asociación entre la expresión alterada de dichos microRNAs y los cambios operados en diversos parámetros clínicos y serológicos asociados a la respuesta a terapia, así como establecer su posible papel como biomarcador de respuesta al tratamiento.

Pacientes y Métodos: Se analizaron muestras de 95 pacientes con AR antes y tras 6 meses de tratamiento combinado con DMARDs/anti-TNF α (Infliximab, etanercept y adalimumab). A todos ellos se les realizó una evaluación clínica (número de articulaciones dolorosas e inflamadas, escala analógica visual de dolor y del estado global de enfermedad, actividad de la enfermedad mediante índices DAS28 y SDAI, número de DMARDs previos, y capacidad funcional mediante HAQ) y serológica (niveles de factor reumatoide, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, interleuquinas IL-6, 17, 12, 23, 22 y 4 y TNF α , receptor del TNF tipo 2 y mediadores inflamatorios como MCP-1 y VEGF) de forma basal y a los 6 meses. El perfil de expresión de los miRNAs se determinó mediante un array de PCR a partir de ARN total de un pool de suero de 10 pacientes (cohorte exploratoria). Los resultados se evaluaron mediante software específico, y se validaron mediante RT-PCR de un set de miRNAs en el resto de los pacientes incluidos en el estudio (Cohorte de validación). Posteriormente se analizó la función de las dianas relacionadas con los miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados en los pacientes a los 6 meses, respecto a los valores basales y si se relacionaban con los mecanismos implicados en la AR. Se realizaron estudios de correlación entre éstos y las distintas variables de evaluación clínica y analítica. Finalmente intentamos establecer si algún/algunos de los miRNAs expresados en nuestros pacientes tenían valor de predictores de respuesta al tratamiento.

Resultados: Los valores medios de todos los parámetros clínicos evaluados se hallaron significativamente disminuidos tras el tratamiento con antiTNF- α . Entre los parámetros resultados del Array indicaron que el 90.1% de los miRNAs se sobreexpresaban tras el tratamiento, y el 9.9% disminuían su expresión. La clasificación funcional de los miRNAs demostró que alrededor del 60% de los miRNAs estaban relacionados con enfermedad

cardiovascular e inmunopatología, activación de células B y T, inflamación y autoinmunidad. Se seleccionaron 10 miRNAs: 5 que presentaron un aumento de su expresión relativa ≥ 2 veces (miR125b, miR23-3p, miR21-5p, miR-126-3p y miR-146a-5p) y 5 que, aunque aumentaron <2 veces su expresión relativa, estaban demostrados como implicados en procesos inflamatorios y autoinmunes como la AR (miR-let-7a-5p, miR-16-5p, miR-124-3p, miR-155-5p y miR-223-3p). De entre los 10 miRNAs seleccionados para la validación del array en el resto de los pacientes (cohorte de validación), 6 se encontraron significativamente aumentados tras el tratamiento con antiTNF- α (miR-125b, miR-146-5p, miR-23-3p, miR-126-3p, miR-16-5p y miR-223-3p) sólo en los pacientes que habían sido clasificados como respondedores y, además observamos, en los estudios de correlación, un cambio paralelo e inverso en los datos de actividad y los parámetros serológicos en este grupo de pacientes. El análisis de los genes diana de los miRNAs validados mostró que todos ellos regulaban rutas inflamatorias implicadas en la AR. miR-146-a, miR-223-3p y miR-16-5p correlacionaron con la actividad de la enfermedad medida por DAS28. Por último, las curvas ROC demostraron, primero que los niveles más altos de miRNAs basales eran predictores de no respuesta, encontrándose puntos de corte para expresión basal de miR23-3p y miR223-3p a partir de los cuales se podía predecir una pobre respuesta al tratamiento con un nivel óptimo de sensibilidad y especificidad. Es más, el estudio de las curvas ROC para el cambio a los 6 meses respecto a la basal para estos dos miRNAs encontró que el punto de corte >1.5 era óptimo para predecir respuesta al tratamiento y que, por tanto, estos dos miRNAs podrían ser usados como biomarcadores de respuesta con una alta especificidad.

3. Conclusiones:

1. El tratamiento con antiTNF- α promueve una alteración significativa de la expresión, en el suero de pacientes con AR, de un gran número de miRNAs asociados a procesos de inflamación y autoinmunidad, activación de células T y B y enfermedad cardiovascular.
2. Existe una correlación significativa entre la expresión de diversos miRNAs (miR-16-5p, miR-23-3p, miR125b-5p, miR-126-3p, miRN-146a-5p, miR-223-3p) y la respuesta positiva al tratamiento, en términos de marcadores de actividad de la enfermedad, afectación articular, inflamación y autoinmunidad.
3. miR-223-3p y miR-23-3p presentan un perfil de cambio tras el tratamiento, que puede identificar a pacientes con mayor probabilidad de responder a la terapia.

Por tanto, dichos miRNAs podrían considerarse potenciales biomarcadores de respuesta al tratamiento con antiTNF- α en pacientes con AR.

Changes in the expression of circulating microRNAs of patients with Rheumatoid Arthritis in response to therapy with anti-tumor necrosis factor alpha agents.

Introduction and aims of the study: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by synovitis, progressive destruction of articular cartilage and underlying bone, along with various extra-articular manifestations (1). Alteration characteristic of RA is persistent inflammatory synovitis or chronic synovitis. Although its course is variable, usually it involves long-term functional disability. RA can also affect other organs or systems, inducing inflammation and fibrosis, early atherosclerosis or systemic manifestations, as marked asthenia, anemia and osteoporosis, a major cause of morbidity and mortality in these patients. It is a chronic disease, so that many patients must receive treatment for long periods of time, leading to possible undesirable effects not only for the patient, but a high economic cost. The advent of anti-tumor necrosis factor alpha (anti-TNF α) drugs has considerably improved medical management in RA patients, although it has been reported to be ineffective in a fraction of them. In fact, it is known that the response to biological treatment is highly variable, and currently the clinical characteristics or laboratory patients are not sufficient to know in advance the response to a particular treatment. In this sense it is important to find clinical, serological, genomic ... factors that help us early diagnosis of the disease and can predict a patient's response to various therapies. These factors are called biomarkers. One of the desirable characteristics of a biomarker should be ease of obtaining, with little invasive techniques for the patient, such as urine, saliva or serum.

In recent years, epigenetics has emerged as a useful tool in the search for new biomarkers. Epigenetic includes the study of those regulatory mechanisms of gene expression that do not involve changes in DNA sequence, and plays a key role in regulating the genome in response to internal or environmental factors. The micro RNAs are single stranded RNA molecules (20-22 nucleotides), noncoding, which regulate gene expression at post-transcriptional level. Plasma levels are modified to certain pathological and therapeutic conditions, which could provide diagnostic biomarkers of treatment response.

Targeting miRNAs by gain or loss of function approaches have brought therapeutic effects in various disease models. They have been studied in various autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, antiphospholipid syndrome, rheumatoid arthritis, etc.), both in tissues and serum and other fluids, such as synovial fluid, being as in other pathologies, levels different miRNAs differ with respect to subjects without the disease. Currently the search for miRNAs as potential biomarkers are proliferating studies attempting to relate different

clinical and serological such as ESR, RF, ACCP, DAS28, etc. However, few studies published to date to analyse the expression of specific miRNAs as predictors of response to treatment with anti-TNF- α in autoimmune diseases.

Therefore, the main objective of this study is to evaluate the in vivo effect of treatment with antiTNF- α drugs on the expression profile of circulating microRNAs in serum of patients with RA as well as the possible association between altered expression of these microRNAs and changes operated in various clinical and serological associated with response to therapy parameters and establish their possible role as a biomarker of treatment response.

Patients and methods: In total, samples of 95 RA patients undergoing anti-TNF α (infliximab, etanercept and adalimumab)/disease-modifying antirheumatic drugs (anti-TNF α /DMARDs) combined treatments were enrolled. Serum samples were obtained at 0 and 6 months and therapeutic efficacy was assessed. All subjects underwent a clinical evaluation (tender and swollen joints, visual analogue scale of pain and overall disease state, disease activity using indexes DAS28 and SDAI, number of previous DMARDs, and functional capacity through HAQ) and serological (levels of rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate –ESR-, C-reactive protein –PCR-, interleukins IL-6, 17, 12, 23, 22 and 4 and TNF α levels, TNF receptor type 2 and inflammatory mediators such as MCP-1 and VEGF) at baseline and 6 months after treatment. Inflammatory parameters were analyzed by Flow-cytomix and correlation studies with clinical and serological variables were also performed. miRNAs were isolated from the serum of 10 patients (exploratory cohort) before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy, cDNA transcribed and pooled, and human serum miRNA polymerase chain reaction (PCR) arrays were performed. With each pool of samples, human serum and plasma miRNA, the PCR arrays identified 84 different miRNAs. Subsequently, selected miRNAs were analyzed in a validation cohort consisting of 85 RA patients. Then the role of miRNAs related targets that were found differentially expressed in patients at 6 months compared to baseline and their relative value to the mechanisms involved in RA was analyzed. Finally we try to establish whether any / some of the miRNAs expressed in our patients were valuable predictors of response to treatment.

Resultados: The mean values of all parameters evaluated were found clinical significantly decreased after treatment with anti-TNF- α . Among the serological parameters, ESR, PCR, FR, TNF, IL-17 and IL-6 were reduced significantly. Array results indicated that 90.1% of miRNAs are overexpressed after treatment, and 9.9% decreased their expression. The functional classification of miRNAs showed that about 60% of miRNAs were related to cardiovascular

disease and immunopathology, activation of B cells and T, inflammation and autoimmunity. 10 miRNAs were selected: 5 which showed an increase ≥ 2 in relative expression (miR125b, miR23-3p, miR21-5p, miR-146a and miR-126-3p-5p) and 5, but increased <2 relative expression, were shown as involved in inflammatory and autoimmune diseases such as RA (miR-let-7a-5p, miR-16-5p, miR-124-3p, miR-155-5p and miR-223-3p). Among the 10 miRNAs selected for validation of the array in the remaining patients (validation cohort), 6/10 were significantly increased after treatment with anti-TNF- α (miR-125b, miR-146-5p, miR-23-3p, miR-126-3p, miR-16-5p and miR-223-3p) only in patients who were classified as responders and also observed, in correlation studies, a parallel and reverse change data and serologic activity parameters in this group. The analysis of the target genes of validated miRNAs showed that all regulated inflammatory pathways involved in RA. miR-146-a, miR-223-3p and miR-16-5p correlated with disease activity measured by DAS28. Finally, ROC curves showed, firstly, that the highest levels of miRNAs at baseline time were predictors of nonresponse, finding the cutoffs for basal expression for miR223-3p miR23-3p which could predict a poor response to treatment with an optimal level of sensitivity and specificity. Moreover, the study of ROC curves for the change at 6 months compared to baseline found that a cutoff > 1.5 for the combination of this two miRNAs was optimal for predicting response to treatment and therefore they could be used as biomarkers of response with high specificity.

Conclusions:

1. Treatment with anti-TNF α promotes a significant alteration of the expression, in serum of RA patients, of a number of miRNAs associated with inflammation and autoimmunity processes, activation of T and B cells and cardiovascular disease.
2. There is a significant correlation between the expression of several miRNAs (miR-16-5p, miR-23-3p, miR125b-5p, miR-126-3p, INRM-146a-5p, miR-223-3p) and positive response to treatment, in terms of markers of disease activity, joint involvement, inflammation and autoimmunity.
3. miR-223-3p and miR-23-3p have a profile change after treatment, which can identify patients most likely to respond to therapy.

Therefore, these miRNAs could be considered potential biomarkers of response to treatment with anti-TNF- α in patients with RA.

Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
1. Introducción.....	9
Artritis Reumatoide.....	9
1. Concepto y epidemiología.....	9
2. Etiopatogenia.....	10
3. Genética.....	12
4. Factores ambientales.....	15
5. Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación y destrucción articular.....	16
5.1. Papel de las células en la patogenia de la AR.....	20
5.2. Papel de las citoquinas en la patogenia de la AR.....	23
5.3. El TNF α en la fisiopatología de la AR.....	25
6. Tratamiento de la AR.....	27
7. Evaluación de la respuesta clínica en AR.....	28
8. Fármacos antiTNFalfa.....	34
A) Estructura molecular de los fármacos bloqueadores del TNF α	35
B) Indicaciones y datos de eficacia.....	36
9. Respuesta inadecuada a fármacos antiTNF α	40
10. Biomarcadores en AR.....	42
A) Biomarcadores clínicos.....	44
B) Biomarcadores serológicos.....	46
C) Biomarcadores genéticos.....	48
Epigenética.....	49
1. Concepto.....	49
2. Estructura del ADN.....	51
3. Mecanismos epigenéticos de silenciamiento transcripcional.....	52
3.1. Metilación del ADN.....	52
3.2. Modificaciones postraslacionales de las histonas.....	53

3.3. Control de la expresión génica por RNA no codificantes.....	54
4. MicroRNAs.....	55
A) Biosíntesis de los miRNAs.....	56
B) Mecanismos de acción y funciones.....	57
C) Regulación de los miRNAs.....	59
5. Relación de epigenética con las enfermedades autoinmunes.....	60
6. Estudios epigenéticos en AR.....	61
2. Hipótesis.....	71
3. Objetivos.....	75
4. Pacientes y Métodos.....	79
1. Pacientes.....	79
2. Recogida de las muestras de sangre y evaluación de los parámetros biológicos	83
2.1. Protocolo de análisis mediante Flow Cytomix.....	84
2.2. Aislamiento del microRNA del suero.....	86
2.3. Análisis del perfil de expresión de los MicroRNA.....	88
2.4. Validación de los resultados obtenidos en el PCR-Array: RT-PCR.....	91
3. Análisis estadístico.....	94
5. Resultados.....	99
1. Respuesta clínica de la terapia combinada antiTNF α /DMARDs.....	99
2. Perfil de miRNAs expresados diferencialmente en el suero de pacientes con AR tras terapia combinada antiTNF α /DMARDs.....	102
3. Validación de los miRNA diferencialmente expresados.....	104
4. Identificación de los posibles mecanismos fisiopatológicos regulados por los miRNAs circulantes diferencialmente expresados en respuesta a la terapia antiTNF α /DMARDs.....	108

5. Las modificaciones ocurridas en los niveles de miRNAs se asocian a los cambios promovidos en las variables clínicas de los pacientes con AR en respuesta a la terapia combinada antiTNF α /DMARDs.....	115
6. Los niveles séricos de los miRNAs hsa-miR-23-3p y has-miR-223-3p como predictores de respuesta a la terapia en pacientes con AR.....	117
6. Discusión.....	123
7. Conclusiones.....	139
8. Bibliografía.....	143
9. Anexos.....	169

ABREVIATURAS

A continuación se presentan las abreviaturas usadas en el manuscrito de la tesis doctoral:

ACR	Colegio Americano de Reumatología, del inglés American College of Rheumatology
ADA	Adalimumab
ADAMTS5	Metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 5, del inglés ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5
AINEs	Antinflamatorios no esteroideos
anti-CCP	Anticuerpos anti-peptidos cíclicos citrulinados
AP1	Proteína activadora 1, del inglés activator protein 1
APC	Gen de la poliposis adenoatosa de colon, del inglés Adenomatous polyposis coli
APRIL	Ligando inductor de la proliferación del linfocito B
AR	Artritis reumatoide
AUC	Área bajo la curva, del inglés Areas under curve
AZA	Azatioprina
BCL2	Proteína 2 del linfoma de células B, del inglés B-cell CLL/Lymphoma 2
Blys	Factor estimulador del linfocito B
BMP	Proteínas morfogénicas del hueso, del inglés Bone morphogenetic protein
BMPR2	Receptor tipo II de la proteína morfogenética del hueso, del inglés bone morphogenetic protein receptor type II
BMPRII	Receptor tipo 2 de las proteínas morfogénicas del hueso, del inglés Bone morphogenetic protein receptor type II
CCND1	Ciclina D1
CDAI	Índice de actividad clínica, del inglés Clinical Disease Activity Index
CHUK	Proteínquinasa, del inglés conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA	Célula presentadora de antígenos
CTLA4	Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
Curva ROC	Curva de Característica operativa del receptor, del inglés receiver operating characteristic curve
CyA	Ciclosporina A
CZP	Certolizumab pegol
DAS28	índice de actividad sobre 28 articulaciones, del inglés disease activity score
DMARDs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, del inglés disease modifying antirheumatic drugs
DNMT	Metiltransferasa de ADN
EC	Epítipo compartido
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EMA	Agencia Europea del Medicamento, del inglés European Medicines Agency
ETA	Etanercept
EULAR	Liga Europea para las enfermedades reumáticas, del inglés European League against rheumatism
EVA	Escala analógica visual, del inglés visual analogue scale o VAS
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
FCLR3	Proteína similar al receptor Fc, del inglés Fc-like receptor 3
FDA	Agencia americana de Alimentos y Medicamentos, en inglés Food and Drug Administration
FGF2	Factor de crecimiento de los fibroblastos, del inglés fibroblast growth factor 2
FOXO1	proteína , forkhead box O1
FR	Factor Reumatoide, en inglés Rheumatoid Factor
FSAR	Fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide
Fv	Fracción variable de las inmunoglobulinas
FZD4	Proteína receptor Frizzled 4, del inglés frizzled class receptor 4
G-CSM	Factor estimulador de las colonias de granulocitos, del inglés Granulocyte colony-stimulating factor

GLM	Golimumab
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, en inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo, del inglés genomic-wide association studies
HACA	Anticuerpos contra la parte humana del fármaco antiTNF- α , del inglés Human Anti-Chimeric Antibody
HAMA	Anticuerpos contra la parte murina del fármaco antiTNF- α , del inglés Human Anti-Mouse Antibody
HAQ	Cuestionario de calidad de vida, del inglés health assessment questionnaire
HCQ	Hidroxicloroquina
HDMD	Base de datos de miRNAs humanos, del inglés Human miRNA and Disease database
HLA	Sistema de antígenos leucocitarios humanos, del inglés Human Leukocyte Antigen
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1, del inglés intracelular adhesión molecule 1)
IF- γ	Interferon gamma
IFX	Infliximab
Ig	Inmunoglobulina
IKK α	Subunidad alfa de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa-bet, del inglés inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IL	Interleuquina
IL1-Ra	Antagonista del receptor de la Interleuquina 1
IL6R	Receptor de la Interleukina 6
IL6ST	Transductor de señal de la IL-6, del inglés IL-6 signal transducer
IPA	Lista de análisis funcional de genes, del inglés Ingenuity pathway analysis
IRAK	quinasa asociada al receptor de la interleukina 1, del inglés interleukin-1 receptor-associated kinase
LFN	Leflunomida
lncRNAs	RNAs de cadena larga

LRP6	Proteína 6 relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad, del inglés low density lipoprotein receptor-related protein 6
LS	Líquido sinovial
LTh	Linfocitos T colaboradores, en inglés helper
Ltreg	Linfocitos T reguladores
MCP-1	Proteína quimiotáctica de los monocitos, del inglés monocyte chemoattractant protein-1
MEC	Matriz extracelular
miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por los miRNAs, del inglés, miRNA-induced silencing complex
miRNAs	micro-RNAs
MMP	Metaloproteasas de la matriz extracelular
mRNA	ARN mensajero
MTHFR	Metiltetrahidrofolato reductas
MTX	Metotrexate
NFkB	Factor nuclear kappa B, del inglés nuclear factor kappa B
NK	Células Natural Killers
OMS	Organización mundial de la salud
PADI	Enzima peptidil arginina deaminasa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica, del inglés Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Proteína C reactiva
PI3K δ	Ssubunidad delta de la quinasa fosfatidilinositol 3, del inglés phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
PIK3C2A	Subunidad alfa de la kinasa 3 fosfatidilinositol-4-fosfato, del inglés phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
PIK3C2D	Subunidad delta catalítica de la kinasa 3 fosfatidilinositol-4,5 bifosfonato, del inglés phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
PRKCE	proteína kinasa C, del inglés protein kinase C, epsilon

PTNP22	Variante funcional de la proteína intracelular de la tirosina fosfatasa N22, del inglés protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa B , del inglés Receptor Activator for Nuclear factor κ B ligand
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B, del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés Reactive Oxygen Species)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAPE	Solución de estreptavidina-ficoeritrina
SDAI	Índice simplificado de actividad, del inglés Simplified Disease Activity Index
SER	Sociedad Española de Reumatología
sIL1-RI	Proteína similar al receptor tipo 1 de la IL1
sIL1-RII	Proteína similar al receptor tipo 2 de la IL1
SJC	Recuento de articulaciones inflamadas, del inglés swollen joint count
SNP	Polimorfismos nucleótido único, del inglés single-nucleotide polymorphisms
SSZ	Sulfasalazina
STAT4	factor transductor de señal y activador de transcripción 4, del inglés signal transducer and activator of transcription 4
sTNFRI	Proteína similar al receptor del TNF
sTNFRII	Proteína similar al receptor soluble del TNF tipo 2
TJC	Recuento de articulaciones dolorosas, del inglés tender joint count
TNF-AIP3	Proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral α , del inglés tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor necrosis factor type alpha
TRAF1/C5	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral/ componente del complemento C5, del inglés TNF receptor associated factor/ complement component 5
TRAF6	Factor asociado al receptor del TNF, del inglés TNF receptor-associated factor
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés vascular endothelial growth factor

VGM	Valoración global por el médico
VGP	Valoración global por el paciente
VSG	Velocidad de sedimentación globular
XIAP	Factor inhibidor de la apoptosis asociado al cromosoma X, del inglés X-linked inhibitor of apoptosis

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

ARTRITIS REUMATOIDE

1. Concepto y epidemiología

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria y sistémica de etiología desconocida, que se caracteriza por la inflamación crónica de múltiples articulaciones y vainas tendinosas de la membrana sinovial, provocando un deterioro progresivo. Aunque la sinovial es el foco principal de la lesión, en la AR se producen cambios sistémicos responsables de las manifestaciones extraarticulares, como vasculitis, glomerulonefritis, pericarditis, pleuritis, escleritis, siendo los nódulos reumatoides la manifestación extrarticular más frecuente. Asimismo, los pacientes que padecen AR pueden sufrir comorbilidades (enfermedad cardiovascular, infecciones, neoplasias, osteoporosis y enfermedad gastrointestinal) con mayor frecuencia que la población general [1]. En España, según datos del estudio sobre prevalencia de las enfermedades reumáticas en la población española, EPISER, llevado a cabo entre 1998 y 1999, se estima que afecta al 0.5% de la población en España mayor de 20 años [2]. Es más frecuente en mujeres, en una proporción aproximada de 3:1 y, aunque puede ocurrir a cualquier edad, tiene un pico de incidencia entre los 40 y los 60 años.

Se sabe que la tendencia al desarrollo de AR puede ser heredada genéticamente. Se trata de una enfermedad heterógena y está influenciada por variaciones en factores ambientales y por las características genéticas del individuo. La incidencia en familiares y en gemelos monocigóticos tiene una concordancia del 20-30%, lo que refleja su componente genético, con un patrón de herencia poligénico. No obstante, además del componente genético, diversos factores ambientales juegan un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. Así, se sabe que el riesgo de padecer AR es 1.5-2 veces mayor en fumadores.

Aunque clásicamente la AR ha sido considerada una enfermedad benigna, distintos estudios han puesto de manifiesto una disminución de la esperanza de vida y un aumento de la mortalidad estandarizada de entre 1 y 2 y, a pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, se ha establecido un acortamiento de la esperanza de vida de entre 5 y 10 años [3].

2. Etiopatogenia de la AR

La AR es una enfermedad sistémica compleja cuya etiopatogenia sólo se conoce en parte. El desarrollo de la enfermedad es el resultado de una compleja interacción entre genotipo, factores ambientales y azar, que desencadenan una activación repetida del sistema inmune innato y adquirido involucrada en la pérdida de la tolerancia inmunológica, la presentación aberrante de autoantígenos y la activación de linfocitos T y B. Todos estos eventos culminan en una hiperplasia sinovial y la destrucción ósea características de la enfermedad, ambas responsables de la inflamación articular y la inflamación sistémica [4]. La membrana sinovial es el tejido más específicamente afectado por la AR y la inflamación de la membrana sinovial es la característica central de la enfermedad, que se acompaña de hiperplasia, neovascularización e infiltración de células inflamatorias.

Así pues, aunque la etiología de la AR es desconocida, se considera una enfermedad genética compleja, en la que diversos genes y factores ambientales, étnicos, geográficos y nutricionales interactúan para causar los eventos patológicos (Figura 1). El inicio de la enfermedad parece ser desencadenado por factores ambientales, en función de una predisposición genética combinada con la alteración de las respuestas inflamatorias (linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas), células sinoviales residentes (fibroblastos sinoviales, células endoteliales y pericitos) y osteoclastos. [5]. La interacción conjunta de estas células induce la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y enzimas que degradan la matriz en el sinovio o membrana sinovial. La mayoría de los pacientes presentan en suero autoanticuerpos como el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP), lo que ha conducido a la clasificación de la AR como una enfermedad autoinmune. Aunque el FR también puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes y condiciones inmunológicas como la infección crónica y en estados inflamatorios, la presencia de anticuerpos anti-CCP es altamente específica, evidencia de que la autoinmunidad frente a proteínas citrulinadas es un factor clave en la patogénesis de la AR. Sin embargo, aproximadamente un 20% de los pacientes no presentan autoanticuerpos, lo que sugiere una heterogeneidad etiológica de la enfermedad [6]. En los últimos años se están produciendo cambios en la comprensión de la patogenia de esta enfermedad, clásicamente considerada ante todo inflamatoria, dado que se consideraba que los linfocitos T eran las células clave de la AR. Sin embargo, los progresos desarrollados en las técnicas de

Biología molecular han identificado nuevas rutas, independientes de la expresión alterada de citoquinas, que también contribuyen a su patogénesis y para las que las estrategias terapéuticas antiinflamatorias o inmunosupresoras disponibles no son efectivas [7].

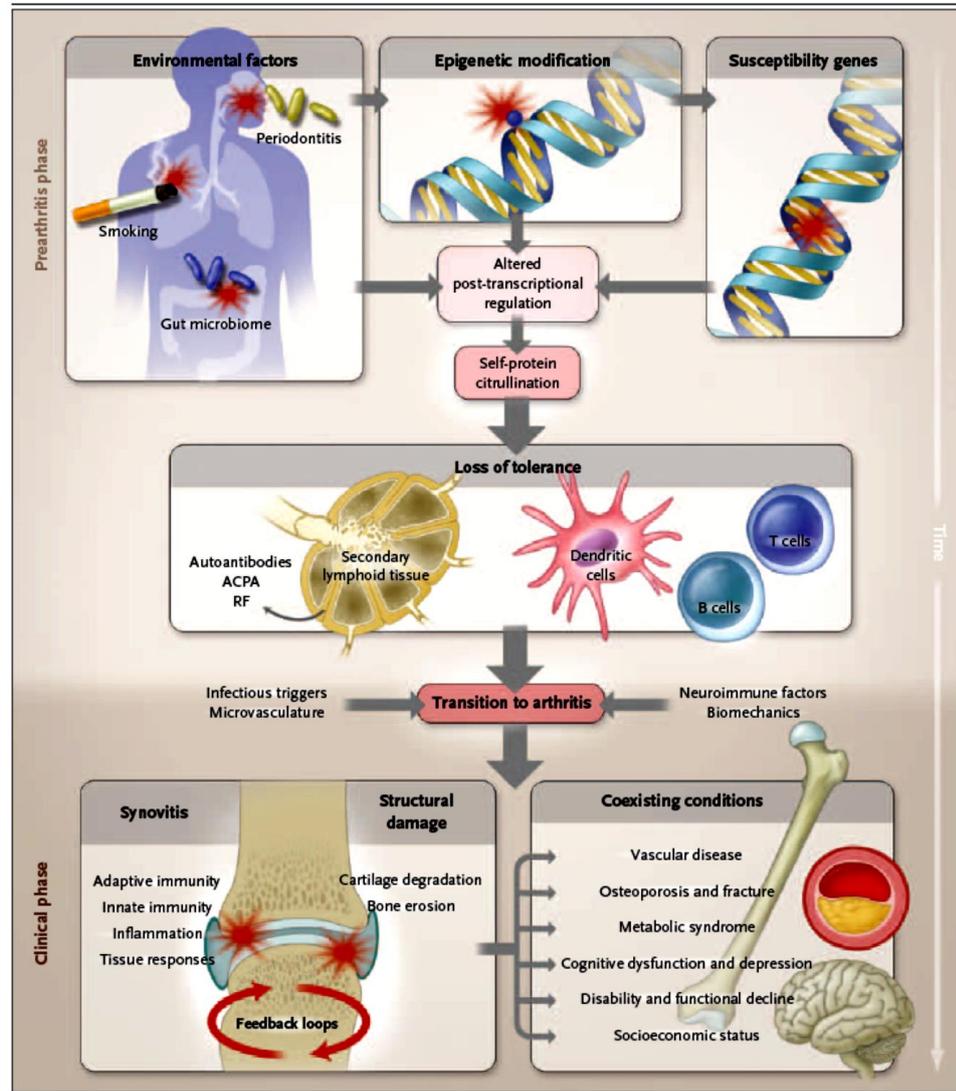


Figura 1. Etiopatogénesis de la AR. Interacciones de los genes con los factores ambientales promueven una pérdida de tolerancia a proteínas propias que contienen residuos de citrulina, generados por modificaciones postranscripcionales. La respuesta anticitrulina puede ser detectada en los compartimentos de linfocitos T y B y probablemente sea iniciado en tejidos linfoides secundarios o en la médula ósea. Posteriormente, la respuesta inflamatoria ocurre en la articulación por mecanismos no bien conocidos que posiblemente involucran vías específicas microvasculares, neurológicas, biomecánicas o de otros tejidos. La sinovitis es iniciada y perpetuada por posibles mecanismos de feed-back que conducen al desorden sistémico que compone el síndrome de la AR. (Tomado de: McInnes IB, Schett G. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365:2205-19) [8])

3. Genética de la AR

Los factores genéticos juegan claramente un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. Se considera que la AR es una enfermedad altamente heredable. Los estudios en gemelos han señalado que los factores genéticos tal vez expliquen incluso el 60% de la frecuencia de AR, pero la estimación más frecuente la sitúan en límites de 10 a 25% [9]. La posibilidad de que un pariente de primer grado de un enfermo desarrolle AR es 2 a 10 veces mayor que en la población general. Sin embargo, existe incertidumbre en cuanto al grado en que la genética interviene en los mecanismos causales de AR. Los gemelos homocigotos de un paciente con AR tienen un riesgo de un 15% de desarrollarla, y el riesgo del hermano de un paciente afectado es de aproximadamente un 5%. El cálculo de la influencia genética puede variar de un estudio a otro, a causa de las interacciones del gen con el entorno [10].

En los últimos años, y gracias al progreso alcanzado para completar el estudio del genoma humano, se han llevado a cabo múltiples investigaciones para identificar posibles marcadores genéticos en la AR [11]. El factor de riesgo genético más importante para la aparición de la AR inequívocamente asociado a la susceptibilidad y gravedad de la enfermedad, corresponde al locus del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) [12], en particular, al sistema de HLA clase II (antígenos leucocitarios humanos, *del inglés "Human Leukocyte Antigen"*), un conjunto de genes implicados en el reconocimiento antigénico y la respuesta inmune, al cual se le atribuye entre un 30 y un 50% del riesgo genético total.

Los principales genes HLA de clase II implicados en la enfermedad son los genes DR1 y DR4, presentes en alrededor del 60% de pacientes [13]. Los alelos del gen HLA-DRB1 (que codifican la molécula de la cadena β de CMH tipo II) son el factor genético mejor conocido y representa el factor genético más importante de todos los factores genéticos conocidos para AR en pacientes positivos para FR o para los anticuerpos anti-CCP. La principal función del HLA-DRB1 es la presentación de antígenos a las células T. Así, diversos estudios han demostrado una fuerte correlación entre la presencia de AR y algunos alelos del HLA-DR [14]. Estos alelos comparten una secuencia común de 5 aminoácidos en la tercera región hipervariable de la molécula DRB1. Esta secuencia común se ha denominado "Epítipo Compartido" (EC), y consiste en la secuencia de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QKRAA), que confiere una particular susceptibilidad para la enfermedad. Estos 5 aminoácidos se encuentran en el sitio de unión al péptido y, por lo tanto, son de suma

importancia durante la presentación antigénica. Basándose en esta observación, Gregersen et al. formularon la “Hipótesis del epítipo compartido” [15], según la cual la enfermedad se produce por una respuesta inmune, a través de la activación de células T CD4+ por un antígeno o antígenos desconocidos presentados al receptor de la célula T por las moléculas DRB1 del HLA de clase II en células presentadoras de antígeno [16]. La teoría del EC propone que los fragmentos procesados de antígenos derivados del daño sinovial en la AR son presentados a la célula T sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno (CPA). Recientemente se ha descubierto que, de estos 5 aminoácidos, que se encuentran formando parte de la hendidura de unión de los antígenos del EC al CMH, dos se encuentran asociados a los genes HLAB y HLA-DP, y los tres restantes a los genes HLA-DR y estos 5 explican casi completamente la asociación entre el CMH y el riesgo de presentar AR [17]. Parece que se producirían alteraciones a nivel de la regulación postranscripcional, dando lugar a proteínas citulinadas, que son reconocidas como extrañas, desencadenando la producción de anticuerpos contra estas proteínas (anti-CCP) en el inicio de la enfermedad [18]. La principal proteína que reconocen estos anticuerpos es la filagrina, la cual sigue una vía de modificaciones postraduccionales por las que los grupos amino terminal de los residuos de arginina son eliminados por la enzima peptidil arginina deaminasa (PADI), convirtiendo los residuos de arginina en citrulina. De esta forma, el blanco antigénico de estos antiCCP serían estos residuos peptídicos de la filagrina. Lo que se produce durante la citrulinación es una serie de procesos físico-químicos que conducen a un cambio en la carga positiva de la arginina hacia una carga neutra de la citrulina; esta nueva estructura del péptido es reconocida por el sistema inmune cuando es presentada por moléculas del HLA Clase II, dado que posee los alelos “epítipo compartido”, de forma que las moléculas del HLA que poseen esta secuencia son un sitio de unión peptídica con carga positiva. Así los péptidos que tienen arginina no se adhieren a él ya que sus cargas se contraponen. En cambio, cuando los residuos de arginina son citrulinados, su carga pasa a ser neutra con sus mismas características polares, lo que permite que se unan con más eficacia a las moléculas HLADR4 y de esta forma puedan ser presentados a los linfocitos T. Estos datos sugieren que la presentación antigénica es un factor relevante en la fisiopatología de la AR, aunque no se ha demostrado la relación de este epítipo con antígenos específicos relacionados de algunas formas de AR. Los alelos del epítipo compartido que llevan esta secuencia son del genotipo DRB1 (*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102 y *1001), y DQB1 (*0302 y *0501), y están asociados con la presencia de los anti-CCP y AR. Posiblemente los linfocitos T que reconocerían estos autoantígenos

citrulinados presentados a través del CMH, estimularían a las células B en la secreción de anti-CCP [19]. Otras posibles explicaciones para la relación entre AR y el EC puede ser por un mimetismo molecular del EC con proteínas microbianas, un posible aumento en el proceso de envejecimiento de linfocitos T inducido por moléculas HLA que contienen el EC y una posible función en la señalización proinflamatoria independiente del papel del EC en el reconocimiento antigénico [20].

Sin embargo, el HLA-DRB1 sólo explica aproximadamente un tercio del componente genético de la AR, por lo que se han buscado otros genes no asociados al HLA. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genomic-wide association studies*) han permitido la identificación de algunos genes sin relación con el CMH que contribuyen a la susceptibilidad de padecer AR [21]. Los GWAS se basan en la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single-nucleotide polymorphisms*), que permiten la caracterización de la estructura genética de enfermedades complejas, como la AR. Dentro del genoma humano, se han identificado unos 10 millones de SNP comunes que consisten en 3.000 millones de pares de bases. Por norma, los GWAS identifican sólo las variantes frecuentes, en particular aquéllas cuya frecuencia es >5% en la población general. Los estudios GWAS en AR han permitido la identificación de polimorfismos genéticos que también contribuyen a su desarrollo, aunque en menor medida que el EC.

Se conocen más de una treintena de genes cuyas variantes se han asociado a su susceptibilidad y/o gravedad de la AR y que, en general, se relacionan con funciones implicadas en la respuesta o activación de los linfocitos T o con elementos relacionados con la regulación de respuestas celulares asociadas a la respuesta inmune e inflamatoria. Entre ellos destaca como segundo mayor gen de susceptibilidad el PTPN22 (variante funcional de la proteína intracelular de la tirosina fosfatasa N22, del inglés *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*), que duplica el riesgo de AR seropositiva en heterocigotos y lo cuadruplica en homocigotos [22].

Otros genes de susceptibilidad de AR en poblaciones de ascendencia europea son: el STAT4 (factor transductor de señal y activador de transcripción 4, del inglés *signal transducer and activator of transcription 4*), un factor de transcripción clave en la regulación de la respuesta inmune que interviene en la señalización de vías que promueven la diferenciación de linfocitos T CD4 a Th1 y Th17, los cuáles están involucrados en la patogenia de la AR [23];

y el TRAF1/C5, el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral/ componente del complemento C5 (*del inglés TNF receptor associated factor/ complement component 5*), que al parecer se vincula de manera exclusiva con una enfermedad con anti-CCP positivos [24]. El gen de la peptidilarginina deaminasa tipo IV (PADI4, *del inglés peptidyl arginine deaminase type IV*) [22] es otro alelo de riesgo que codifica una enzima que interviene en la conversión de arginina en citrulina y, según algunos autores, interviene de manera definitiva en la generación de anticuerpos contra antígenos citrulinados. El polimorfismo de PADI4 se ha vinculado sólo con AR en poblaciones asiáticas. Otros SNP vinculados con AR identificados son: genes que codifican la cascada metabólica del factor nuclear kappa B (NFKappa β , *del inglés nuclear factor kappa beta*) (CD40, CD244, CCL21, PRKCQ, TNFRSF14, PIP4K2C, IL-1B, IL-2RB, IL-2RA), la proteína similar al receptor Fc (FCLR3), la proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF-AIP3, *del inglés tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*) y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4). Los genes mencionados codifican proteínas que intervienen de diversas formas en el envío de señales de linfocitos B y T [25,26,27]. En la figura 2 se representa la evolución de la descripción de marcadores genéticos de susceptibilidad en AR.

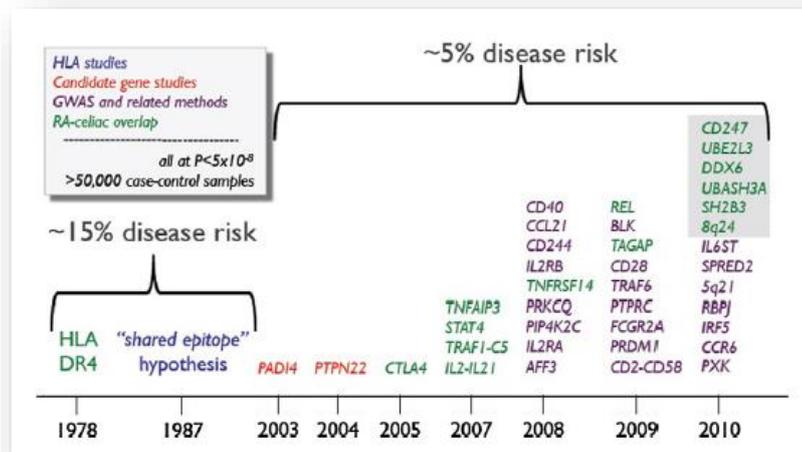


Figura 2. Genes de susceptibilidad en AR. Tomado de Stahl E, Raychaudhuri S, Plenge R. Pharmacogenomics Research Network (PGRN), Research in Progress Seminars (RIPS); 2011. p. 66-82 [28]

4. Factores ambientales

Como se ha comentado anteriormente, los factores genéticos justifican aproximadamente el 50% del riesgo de AR. El hecho de que genotipos similares, como ocurre en gemelos, tengan distinta probabilidad de desarrollar la enfermedad, sugiere que además

de la predisposición genética, diversos factores ambientales intervienen en la patogenia de AR. Los factores ambientales tienen también un efecto en la inducción, magnitud y velocidad de progresión de la AR.

Diversos estudios han demostrado que uno de los principales factores relacionados con un incremento en el riesgo de desarrollar AR es el tabaco, siendo el riesgo relativo de AR de 1.5 a 3.5. Así, el gemelo que fuma presentará un riesgo notablemente mayor de tener RA que su gemelo monocigoto, en teoría con el mismo riesgo genético, pero que no fuma. Como dato interesante, el riesgo proveniente del tabaquismo se vincula casi de manera exclusiva con la enfermedad, junto a la presencia de FR y anti-CCP positivos. Se ha observado una correlación entre la presencia del alelo HDB1*0401 y de antiCCPs positivos en individuos fumadores con AR; asimismo, el riesgo de desarrollar AR en pacientes antiCCP positivo es 20 veces mayor para pacientes fumadores [29]. El mecanismo desencadenante podría ser la activación de la enzima PADI4, que produce una alteración de la citrulinización de proteínas mucosas. Otros factores potenciales pueden ser otras formas de estrés bronquial, como la exposición al polvo de sílice, factores hormonales y factores dietéticos, como el déficit de vitamina D.

La implicación de las infecciones en la patogenia de la AR se basa en numerosas observaciones indirectas. Se ha postulado que agentes infecciosos como el virus de Epstein-Barr y otros herpesvirus, el Citomegalovirus, el parvovirus B19, los retrovirus y las micobacterias, entre otros, pueden estar implicados en la patogenia de la enfermedad, a través de la formación de complejos inmunes durante la infección mediante mecanismos de mimetismo molecular [30]. Asimismo, bacterias asociadas a la enfermedad periodontal, como *Porphyromonas gingivalis*, la única bacteria que causa infecciones en humanos y que expresa PADI, podrían favorecer la producción de anti-CCP y desencadenar AR [31]. No hay pruebas epidemiológicas ni microbiológicas sólidas que impliquen causalmente a un agente infeccioso específico, lo cual no excluye que la exposición a agentes infecciosos comunes contribuya de alguna forma, en sujetos genéticamente predispuestos, a modelar el sistema inmune, favoreciendo el desarrollo de la AR.

5. Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación y la destrucción articular

La patogenia de la AR es un escenario complejo que, hasta la fecha, no se conoce completamente. Como se ha comentado previamente, a la luz de los estudios disponibles, se postula que la interacción entre factores genéticos y ambientales y la activación repetida del

sistema inmune innato y adaptativo conducen a la pérdida de la tolerancia inmunológica en individuos genéticamente predispuestos, la presentación aberrante de autoantígenos y la activación de linfocitos B y T antígeno-específicos, que culmina en un proceso de hiperplasia sinovial y destrucción ósea.

La lesión fundamental de la AR se produce en la sinovial articular. La membrana sinovial normal está formada por tejido conectivo escasamente celular con algunos adipocitos, fibroblastos y capilares aislados; ocasionalmente se detectan algunas células mononucleares infiltrantes, incluyendo macrófagos y linfocitos, pero en número muy escaso. Recubriendo la parte interna de esta membrana, y en contacto con el líquido sinovial, se encuentra una capa bordeante de sinoviocitos, que forman una estructura avascular de una o dos células de profundidad sin membrana basal que las separa del resto de la sinovial. Existen dos tipos de sinoviocitos: los tipo A, con características de células macrófágicas (abundantes lisosomas, Golgi prominente, escaso retículo endoplásmico rugoso, expresión de marcadores macrófágicos como receptores Fc, HLA DR y CD14); y los tipo B (también llamados fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide, FSAR), con características de células fibroblásticas (abundante retículo endoplásmico rugoso, nucleolos arcados y múltiples, morfología bipolar y ausencia de marcadores macrófágicos) [32]. En la figura 3 se muestra de forma esquemática la estructura de la sinovial normal y los cambios que se producen en la AR.

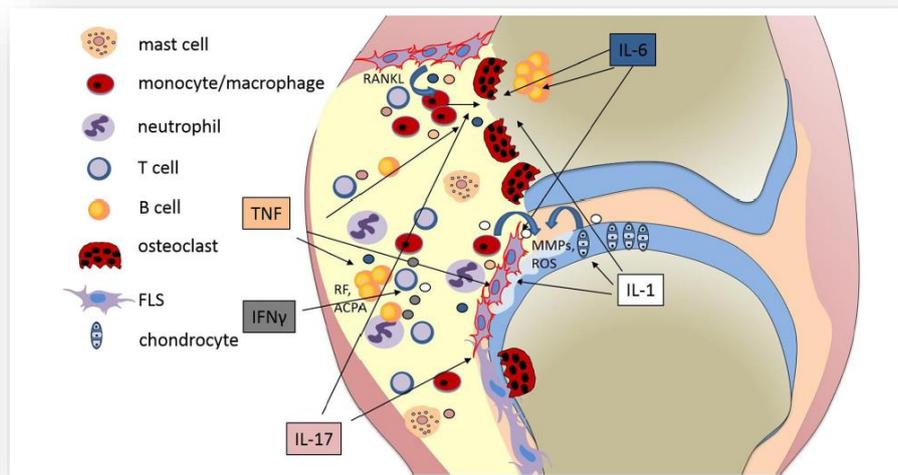


Figura 3. Representación esquemática de los eventos patogénicos en la sinovitis. (Tomado de Blüm S, Redlich K, Smolen JS. *Semin Immunopathol.* 2014; 36: 531-540) [33]

La sinovitis reumatoide se caracteriza por un proceso de infiltración celular y crecimiento hiperplásico de la membrana sinovial, que conduce a la destrucción del cartílago y a la erosión del hueso subcondral con la consiguiente limitación funcional.

En la membrana sinovial que tapiza la superficie articular y las vainas tendinosas se produce una migración (favorecida por activación endotelial en los microvasos sinoviales, que incrementan la expresión de moléculas de adhesión) y posteriormente una infiltración por diversas células inflamatorias, entre las que los linfocitos Th17, secretores de la citoquina con mayor efecto proinflamatorio, la interleucina (IL) 17, parecen desempeñar un papel iniciador, interaccionando con células dendríticas (CD), macrófagos y linfocitos B (Figura 4).

Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatología y la magnitud de su infiltración se correlaciona con los síntomas, probablemente debido a la secreción de mediadores proinflamatorios claves, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la IL-1, implicadas en la perpetuación de la inflamación crónica en la AR.

Los fibroblastos sinoviales son inicialmente activados por el microambiente local, lo que conlleva a una dramática hiperplasia de los mismos, adquiriendo un fenotipo activado pseudomaligno que conduce a la destrucción articular y la persistencia del fenómeno inflamatorio. Los FSAR tienen un papel clave en la integración de señales inflamatorias en la sinovial inflamada y median el daño tisular directo y la persistencia de la infiltración celular en la enfermedad establecida, a través de la activación de oncogenes, inhibición de la apoptosis y secreción de citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz y catepsinas, que median el proceso inflamatorio crónico y catalizan la destrucción articular [34]. Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos (células plasmáticas sinoviales), como células activadoras de los linfocitos T (en su función de CPA) y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF- α y linfoxina β . Los linfocitos T y B pueden formar agregados linfoides en el tejido sinovial, lo que sugiere que la presentación de antígenos tiene lugar localmente, mientras que en otros pacientes los linfocitos B se distribuyen en agregados o difusamente [35]. Por último, se produce una activación e hiperplasia de los mastocitos a nivel articular. La función de las células T CD4+ reguladoras está disminuida, lo que contribuye al desequilibrio entre los brazos efector y regulador de la inmunidad.

El crecimiento e hiperplasia de los FSAR conduce a una acumulación en la zona limitante formando múltiples capas superpuestas, intercaladas por macrófagos, que en sus extremos forman un frente invasivo, denominado pannus, que invade el hueso y el cartílago

adyacentes. En el borde de invasión y erosión del hueso se observan células grandes multinucleadas que son osteoclastos maduros funcionalmente activos, que producen resorción, dando lugar a las erosiones óseas características de la enfermedad. La función atribuida a estos sinoviocitos es la agresión y destrucción del cartílago a través de la síntesis de enzimas que degradan la matriz cartilaginosa, aunque su participación en la patología reumatoide incluye otros procesos. En este medio, estas células producen múltiples factores que contribuyen al reclutamiento y supervivencia de las células linfoides y mieloides que infiltran el tejido, y al desarrollo de neovasos o angiogénesis. El tejido inflamatorio o pannus adquiere la capacidad de invadir y destruir el cartílago articular adyacente [35].

La angiogénesis se refiere a la formación de nuevos capilares o neovascularización a partir de vasos preexistentes, a diferencia de la vasculogénesis o formación de capilares de novo a partir de células precursoras endoteliales. La angiogénesis es un proceso precoz y crítico en la fisiopatología de la AR, que depende de la activación, la migración y la proliferación de células endoteliales, con un papel importante de la IL-17. El aumento de la vascularización parece necesario para la nutrición y crecimiento del tejido sinovial y, además, proporciona un lecho que favorece la adhesión y reclutamiento de las células que componen el infiltrado sinovial, dos pilares necesarios para la persistencia de la sinovitis crónica. Sin embargo, el consumo excesivo de oxígeno derivado del crecimiento sinovial reumatoide siempre supera el aporte, resultando en una situación de hipoxia crónica a la que diferentes células responden en sentido proangiogénico y también proinflamatorio [36,37].

Por otra parte, en el proceso inflamatorio articular intervienen una serie de cascadas inflamatorias, desencadenadas probablemente por la inmunidad adaptativa, tanto en los pacientes que presentan FR o anti-CCP como en los que no. Las citoquinas proinflamatorias actúan como moléculas efectoras fundamentales. El TNF- α y la IL-1 son los principales componentes del proceso inflamatorio y parecen actuar sinérgicamente. El TNF α es un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios (citoquinas, metaloproteinasas, óxido nítrico, prostaglandina E₂, etc.), mientras que la IL-1 media la destrucción de cartílago y hueso (a través de la secreción de metaloproteinasas, disminución de la síntesis de glucosaminoglucanos, etc.). Los inhibidores naturales de las citoquinas proinflamatorias, tales como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL1-Ra), las moléculas homólogas al receptor de la IL-1 (sIL1-RI y sIL1-RII), P (receptores similares al receptor tipo 2 de la IL1), sTNFRI y sTNF-RII (receptores similares al receptor tipo 1 y 2 del TNF), están incrementados, pero no lo suficiente como para contrarrestar el efecto. Las vías de

transducción de señales intracelulares también pueden estar implicadas en la patogénesis de la AR (vías de la quinasa Janus, quinasas proteínicas activadoras de mitógenos, NFK β , quinasa c-Jun N-terminal, RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B, etc.).

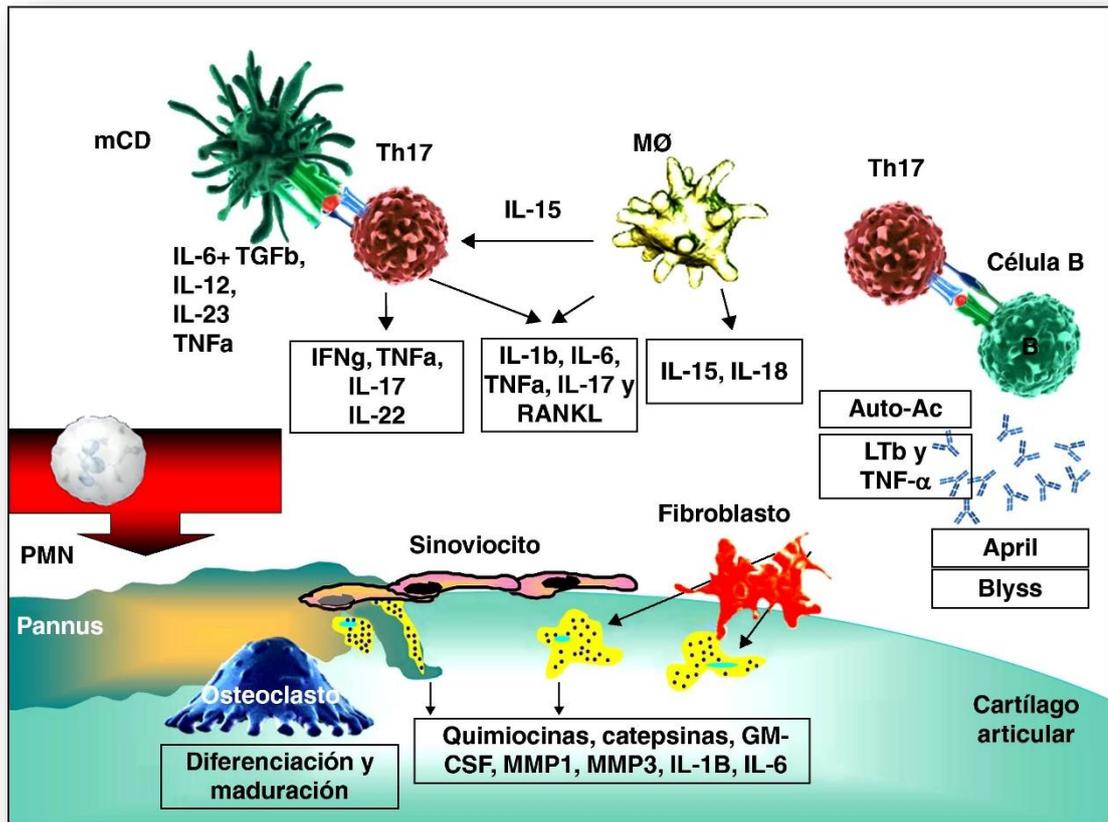


Figura 4. Esquema de la fisiopatología de la AR. Interacción de las principales células implicadas en la fisiopatología de la sinovitis y resorción ósea, culminando en la liberación de enzimas y daño tisular (CD: células dendríticas, M ϕ : macrófagos, GM-CSF: factor estimulador de la colonias de macrófagos y granulocitos, MMP: metaloproteinasa, IL: interleucina, LT β : linfotóxina beta, TGF β : Factor de crecimiento transformante beta, April: ligando inductor de la proliferación del linfocito B, Blyss: factor estimulador del linfocito B)

Tomado de Sánchez-Ramón, S.; López-Longo, F. J.; Carreño, L. *Reumatología Clínica*. 2011; 6(S3), S20– S24 (2011) [37]

5.1. Papel de los linfocitos en la patogénesis de la AR

La AR se considera una enfermedad autoinmune y, en la mayoría de los pacientes, se detecta una producción incrementada de autoanticuerpos que reconocen determinados autoantígenos. La generación inapropiada de células B autorreactivas es la alteración del

sistema inmune más evidente en estos pacientes, ya que se detectan células B autorreactivas y autoanticuerpos antes de que aparezca la enfermedad. Los más importantes son el FR, un autoanticuerpo que reconoce como autoantígeno la región constante (Fc) de la inmunoglobulina (Ig) G, y los anticuerpos anti-CCP. Estas 2 respuestas son bastante específicas y se postula que la formación local o sistémica de inmunocomplejos, su acumulación articular, y la activación local de factores del complemento y de células efectoras, a través de receptores celulares de inmunoglobulinas (Fc γ R) o de receptores de factores del complemento (C3/C5aR), son un mecanismo central en la patogenia de la inflamación articular crónica. La activación de estos receptores en macrófagos induciría la producción de citoquinas y otros mediadores. Sin embargo, hay importantes lagunas en el modelo de los autoanticuerpos: a) existe al menos un 20% de pacientes con AR en los que no se detectan; b) los autoantígenos no son específicos del tejido articular; c) no son consistentes las respuestas T frente a estos autoantígenos; d) pueden preceder largo tiempo a la enfermedad y persisten indefinidamente tras la remisión terapéuticamente inducida.

La implicación de respuestas T anormales en la patogenia de la enfermedad tiene también sólidos apoyos. En primer lugar, la importante asociación genética de la AR con alelos del HLA-DRB1 con el epitopo compartido, relacionado con la presentación antigénica a células T, y con otros genes como PTPN22, STAT4, CTLA4, etc. implicados en la activación de células T. En segundo lugar, la abundancia de células T CD4 de memoria en los infiltrados sinoviales. Las respuestas T anormales no son específicas de los autoantígenos B conocidos (péptidos citrulinados) y se han observado otras de significado peor establecido, como respuestas a proteínas bacterianas de estrés. Es posible que la interacción T/B necesaria para el desarrollo de respuestas B específicas (autoanticuerpos) no sea dependiente de respuestas T primarias frente al mismo autoantígeno, sino de la cooperación con células T no específicas.

Los mediadores locales producidos por las abundantes células T sinoviales que contribuirían a la sinovitis son aun controvertidos. Hay varios tipos de respuestas T, según su producción de citoquinas, implicadas en diferentes formas de inflamación, principalmente linfocitos T colaboradores (LTh) Th1, Th2 y Th17. Tradicionalmente se ha considerado que las células T implicadas en la AR serían Th1 o productoras de interferon-gamma (IFN- γ). Sin embargo, se ha propuesto recientemente que el modelo de células Th17, o productoras de IL-17, se adapta mejor a los datos observados en la AR, donde IL-17 es abundante, aunque no existe una prueba definitiva de la relevancia de esta citoquina o de las respuestas Th17 en

la AR [38]. Según este modelo, las citoquinas T locales activarían la producción de citoquinas proinflamatorias efectoras por macrófagos y fibroblastos. Aunque parece que los elementos de la autoinmunidad específica, autoanticuerpos y células T, podrían ser responsables del proceso de inflamación crónica articular, no hay datos suficientes que permitan conocer qué es lo que inicia el proceso patológico sinovial descrito y su manifestación clínica en el sujeto genéticamente predisuesto.

Los procesos patológicos anteriormente citados son dependientes de interacciones celulares complejas, cuyos factores moleculares solo se han identificado parcialmente. La producción local de citoquinas por los macrófagos activados puede deberse a anticuerpos, complemento o citoquinas procedentes de células T activadas y esta parece suficiente para conducir el proceso inflamatorio crónico. De estos factores macrofágicos, los más potentes y multifuncionales son las citoquinas IL-1 β y TNF α . La exposición de células sinoviales residentes, como sinoviocitos fibroblásticos y células endoteliales, al TNF α es capaz de inducir la activación de cascadas intracelulares de activación transcripcional de la expresión de numerosos genes proinflamatorios. Esta cascada induce el reclutamiento celular desde el torrente circulatorio y su acumulación e interacción local. Del efecto de estos factores resulta el crecimiento y supervivencia de este tejido sinovial inflamatorio que, a través de la producción de enzimas que degradan la matriz del cartílago y de la diferenciación de osteoclastos desde células mononucleares precursoras, destruye el hueso y cartílago adyacentes. Las células Th1 y Th2 poseen efectos inhibitorios en la osteoclastogénesis a través de la secreción de IFN- γ e IL-4 respectivamente [38] (Figura 5).

Los fibroblastos sinoviales expuestos a TNF α modifican la estructura de la cromatina de manera estable en el tiempo, facilitando la interacción de importantes factores de transcripción como NF- κ B, AP1 (proteína activadora 1, del inglés *activator protein 1*) o STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción), responsables de la expresión de múltiples genes proinflamatorios [39,40].

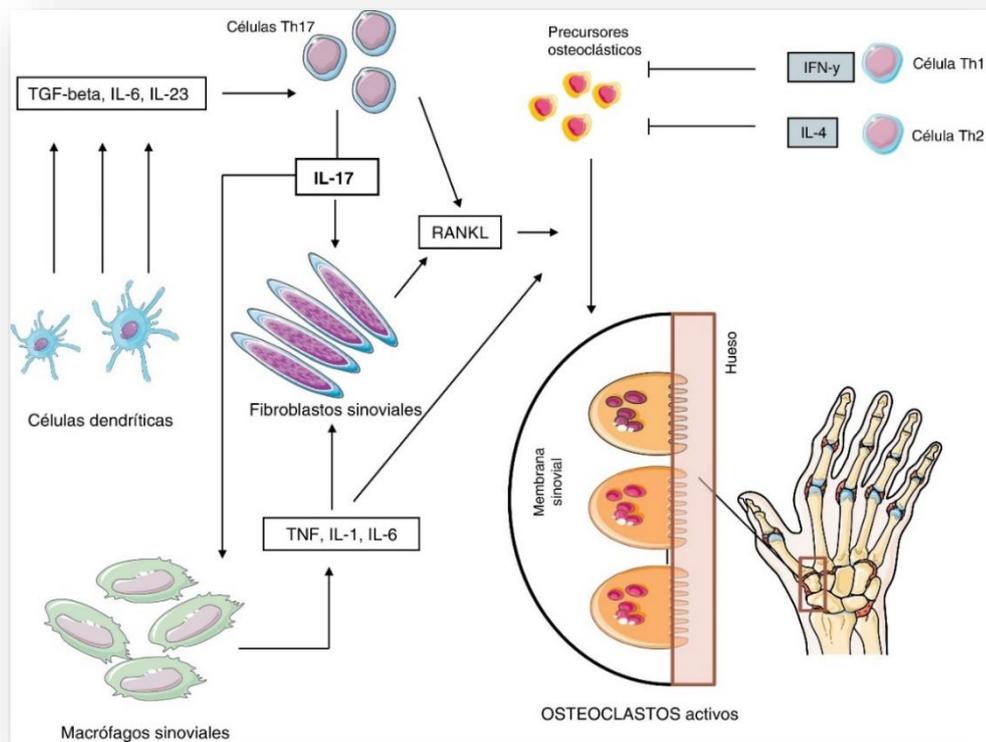


Figura 5. Patogénesis de la erosión reumatoide (IFN- γ : interferón gamma) (Tomado de: Arboleya, L., Castañeda, S. *Reumatología Clínica*. 2013; 9, 303-315 [38]).

5.2. Papel de las citoquinas en la patogénesis de la AR

Las citoquinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular con una vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico y que actúan como mediadores fundamentales en la transmisión de señales intercelulares. La secreción de citoquinas constituye un mecanismo fundamental en la modulación de la respuesta inmunológica. De forma general, la inflamación característica de la AR es debida a la predominancia de citoquinas inflamatorias sobre las proinflamatorias (Figura 6).

Las células en la membrana sinovial inflamada y en el pannus secretan citoquinas, como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 e IL-23, que contribuyen a la inflamación y que pueden afectar directamente al hueso. Se podría decir que las citoquinas median el progreso de la AR (precoz, aguda y establecida).

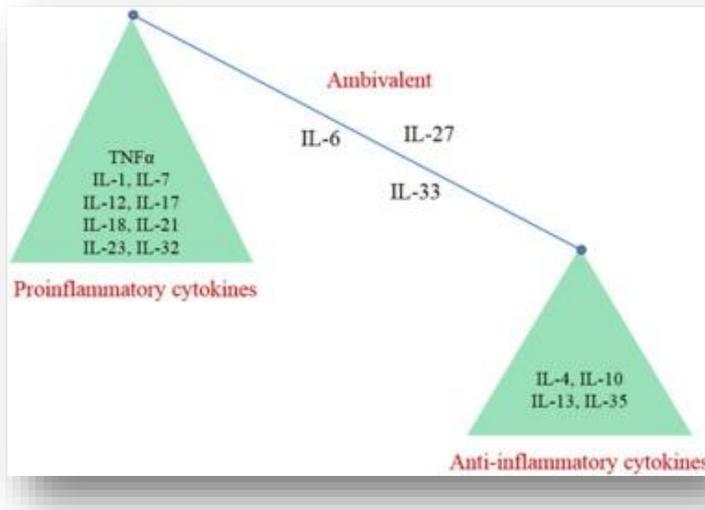


Figura 6. Desequilibrio del balance de citoquinas pro y antiinflamatorias en AR. Tomado de: Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubari S. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 455: 161-171 [41]

De entre las citoquinas producidas por los diferentes tipos celulares implicados en la fisiopatología de la AR, describimos a continuación el papel de algunas de ellas, con una demostrada implicación en el desarrollo de la enfermedad, de forma breve. Dado que en nuestro trabajo evaluamos la respuesta al bloqueo del TNF α , desarrollamos en un epígrafe aparte una pequeña revisión sobre las características y funciones de esta molécula.

El TNF- α y la IL-6 son citoquinas proinflamatorias que actúan sinérgicamente como moléculas efectoras fundamentales y son los principales componentes del proceso inflamatorio [42]. El TNF- α es un mediador clave para la producción de otras citoquinas, metaloproteinasas, óxido nítrico, prostaglandina E2, etc. Es secretado por diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B y fibroblastos y estimula a gran cantidad de células, promoviendo la inflamación.

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria pleiotrópica con efectos variados sobre las líneas celulares hematopoyéticas, como la inducción de la producción de inmunoglobulinas por las células B, la proliferación de las células T, la inducción de la síntesis de las proteínas de fase aguda hepáticas y la diferenciación en las células T citotóxicas.

La IL-1 β participa en la destrucción del cartílago y el hueso subcondral a través de la secreción de metaloproteinasas, la disminución de la síntesis de glucosaminoglicanos, etc.

La IL-23 tiene efectos proinflamatorios y promueve respuestas inflamatorias de modo sinérgico con la IL-12. Es uno de los factores esenciales para la supervivencia y/o expansión de los linfocitos Th17 y, por otra parte, induce la secreción de IL-17 por células no-T. La

interacción entre la IL-23 y la IL-17 desempeña un papel fundamental tanto en las fases precoces de la AR como en la fase destructiva, ya que induce la expresión del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) en precursores mieloides y de su ligando, el RANKL, en los LTh. Además, la IL-23 estimula la producción de IL-1 β y TNF- α [43].

La IL-18 induce la activación de los linfocitos T citotóxicos y células Natural Killers (NK) [44], induciendo a su vez la secreción de IFN- γ por dichas células.

La IL-27 se produce en las CPA en presencia de infección e INF- γ . Induce efectos pleiotrópicos sobre diversas células del sistema inmunológico y tiene propiedades pro- y anti-inflamatorias [45].

La IL-32 es una citoquina proinflamatoria que se ha encontrado en células NK y en linfocitos T activados.

La IL-35 es una citoquina perteneciente a la familia de la IL-12; se produce en los linfocitos T CD4+ reguladores y se ha demostrado que, in vitro, es capaz de inhibir la actividad de los linfocitos Th 17.

Otras citoquinas importantes en la patogenia de la AR son el factor estimulador del linfocito B (BLyS) y el ligando inductor de la proliferación del linfocito B (APRIL). El bloqueo de estas citoquinas podría ser importante en el tratamiento de la AR [37].

5.3. El TNF α en la fisiopatología de la AR

El TNF α juega un papel principal en la AR y es una de las citoquinas más importantes que provoca inflamación. Se produce principalmente por los macrófagos activados pero también puede producirse por los monocitos, fibroblastos, mastocitos y células NK. Ejerce su acción a través de dos receptores, un receptor de 55 KD conocido como p55 o TNF-R1 y otro de 75 KD conocido como p75 o TNF-RII. El receptor p55 se expresa en la mayoría de los tejidos y se une tanto a la forma soluble como a la transmembrana del TNF α , mientras que la expresión del receptor p75 se produce específicamente en las células inmunes y sólo se une a las formas transmembrana. El principal receptor responsable de la señalización intracelular parece ser el TNF-R1, mientras que el TNF-RII potencia su actividad. Ambos receptores pueden presentarse de forma soluble debido a la acción del dominio extracelular del receptor por metaloproteasas. Las formas solubles actúan como inhibidores naturales de la actividad del TNF- α , ya que compite con esta citoquina en los receptores transmembranales, bloqueando su actividad. Así, tanto el receptor tipo I como el II no sólo ejercen su acción en la transducción

de las señales, sino que también ejercen funciones autorreguladoras extracelulares que afectan a la biodisponibilidad del TNF- α . [46,47].

El TNF- α , induce la expresión de selectinas e integrinas y susreceptores en células endoteliales permitiendo la adhesión firme de los leucocitos. A su vez, estimula en células endoteliales y macrófagos la expresión de citoquinas y quimioquinas. En el torrente sanguíneo actúa a distancia y ejerce acciones sistémicas: sobre el hipotálamo, junto con la IL-1, produce fiebre; sobre los hepatocitos, aumenta la síntesis de proteínas séricas, como la proteína A amiloide y el fibrinógeno, junto con la IL-1 y la IL-6; su producción prolongada da lugar a las alteraciones metabólicas de la caquexia, con pérdida de células musculares y adiposas; inhibe la síntesis de lipoproteína lipasa, enzima necesaria para liberar los ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes de manera que puedan ser utilizadas en los tejidos; reduce la glucosa plasmática; produce trombosis intravascular por alteración de las propiedades anticoagulantes del endotelio; estimula en las células endoteliales la expresión del factor tisular, un activador potente de la coagulación, que ante la presencia de neutrófilos activados dan lugar a trombosis y, que, en tumores, conlleva a la necrosis del mismo (de ahí su nombre).

En pacientes con AR se han encontrado niveles elevados de TNF α , el cuál es responsable de la inflamación y destrucción de articular (Figura 7). Se sabe que estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B, T y células NK. También induce la producción de otras citoquinas inflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8 y MMPs. Por otra parte, actuando sobre las células sinoviales, puede inducir la estimulación de estromelisina, colagenasa, prostaglandinas y GM-CSF (factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos, en inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*). También estimula la expresión de moléculas de adhesión como las ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular 1, del inglés *intracellular adhesion molecule 1*) por los fibroblastos. Además, induce la destrucción ósea por la vía del RANKL [48]. Recientes evidencias sugieren que además puede tener algún efecto antiinflamatorio como se ha evidenciado por un descenso en la severidad de la diabetes en ratas no obesas. Este efecto antiinflamatorio del TNF α parece que está mediado por el TNF-2 a través de la acción del TGF- β [49].

La región promotora del gen del TNF está relacionada con la mayoría de los SNPs observados en los pacientes con AR. El primer polimorfismo identificado es la transición de guanina a adenosina en posición -308. Este polimorfismo se asocia con una producción de TNF α reducida y se relaciona con varios desórdenes autoinmunes. Se ha demostrado que

polimorfismos en las posiciones -238 G/A y +498 G/A se asocian con mayor severidad de la enfermedad.

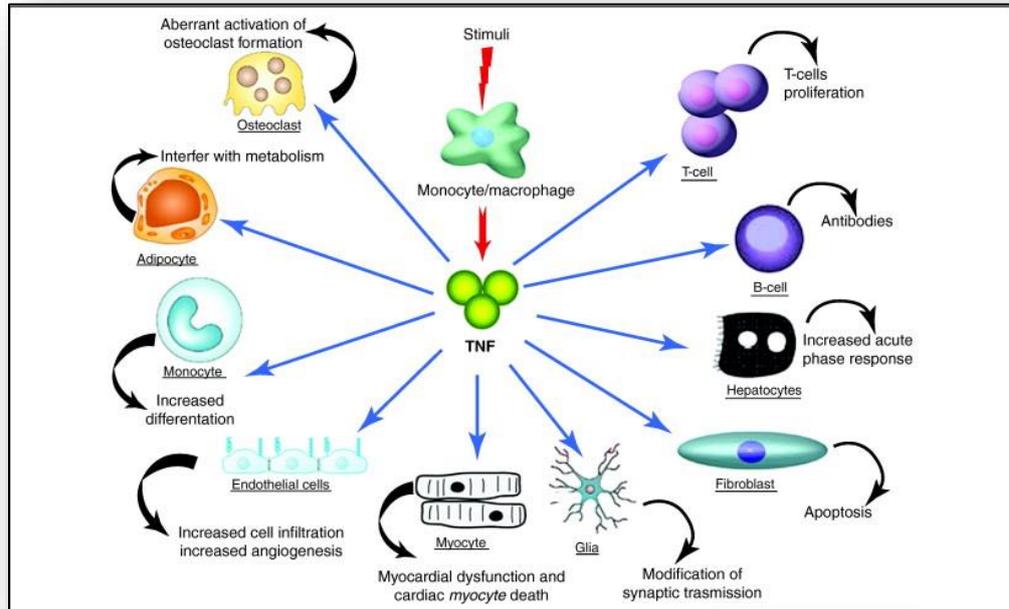


Figura 7. Funciones del TNF α en las células implicadas en la AR.

6. Tratamiento de la AR

El tratamiento de la AR ha experimentado avances muy importantes durante la última década. Esto se debe en gran medida a dos circunstancias principales: 1) El desarrollo de tratamientos alternativos a los fármacos inductores de remisión o modificadores de la enfermedad (DMARDs, o *disease modifying antirheumatic drugs*) clásicos o sintéticos: los tratamientos llamados DMARDs biológicos, y 2) el desarrollo de una estrategia terapéutica más ambiciosa, que utiliza los distintos tratamientos de forma más eficiente para conseguir la remisión de la enfermedad. Las sociedades científicas han elaborado guías de consenso para el tratamiento en los pacientes con AR. En este sentido, la Sociedad Española de Reumatología (SER) emitió un documento de consenso, que ha sido recientemente actualizado [50], con el objetivo de establecer recomendaciones para el manejo de los pacientes con AR, centrado en el papel de los DMARDs sintéticos y biológicos disponibles. Según este panel de consenso se establecen como recomendaciones iniciales el uso de DMARDs sintéticos en cuanto se realice el diagnóstico de AR (grado de evidencia 1a) para

conseguir el objetivo terapéutico (la remisión clínica o, en su defecto, un grado de baja actividad inflamatoria de forma persistente). El DMARD recomendado es metotrexato (MTX) como fármaco inicial y, en caso de intolerancia o contraindicación al mismo, se podría iniciar otros DMARDs sintéticos como la leflunomida o la sulfasalazina (evidencia 1a). Asimismo, se recomienda el uso de bajas dosis de glucocorticoides en el tratamiento inicial de la AR (en combinación con uno o más DMARDs sintéticos) durante los primeros meses y reducir la dosis progresivamente con el objetivo de su retirada definitiva (evidencia 1a). Cuando el objetivo terapéutico no se ha alcanzado con la primera estrategia de uso de DMARD sintético, se pueden utilizar otros DMARDs sintéticos en terapia secuencial o combinada, o añadir un biológico, en función de las características del paciente y la presencia de factores de mal pronóstico. En pacientes con AR activa en los que se considere indicado comenzar terapia con un biológico se pueden utilizar, en combinación con MTX/otros DMARDs sintéticos, fármacos anti-TNF α , Abatacept (que bloquea el linfocito T), Tocilizumab (inhibidor de la IL-6) o, en determinadas circunstancias, Rituximab (bloqueo de linfocito B) (evidencia 1b). En pacientes con intolerancia o contraindicación a DMARDs sintéticos se puede utilizar tratamiento biológico en monoterapia, siendo de preferencia en este caso Tocilizumab (evidencia 1b). Se recomienda que, después del fracaso a un primer DMARD biológico, el paciente sea tratado con otro DMARD biológico (evidencia 1b). Si el primero ha sido un anti-TNF α , el paciente puede recibir otro anti-TNF u otro DMARD biológico con un mecanismo de acción diferente.

7. Evaluación de la Respuesta clínica en AR

La utilización de índices que resuman la información de varios parámetros en un sólo indicador es un procedimiento útil y válido en la evaluación de la actividad de la enfermedad. La SER recomienda, siguiendo el consenso aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Liga europea para las enfermedades reumáticas (EULAR, del inglés *European league against rheumatoid arthritis*) y el Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés *American college of rheumatology*) en la conferencia OMERACT para el consenso en las medidas de resultado en reumatología (*Outcome measures in Rheumatology*), celebrada en Maastricht en 1992, que el conjunto mínimo de parámetros que se deben medir en todos los pacientes con AR para evaluar la actividad de la enfermedad son [51]:

- Valoración de la actividad:

- Número de articulaciones dolorosas (TJC, del inglés *Tender Joint Count*) y tumefactas (SJC, del inglés *Swollen Joint Count*). Se recomienda un mínimo recuento de 28 articulaciones.
- Valoración global de la enfermedad por el paciente (VGP) y por el médico (VGM) utilizando la escala analógica visual (EVA) de 0 a 100 cm. Se recomienda que la escala se encuentre dividida mediante marcas verticales en 10 segmentos de 1 cm. Las mediciones se acompañarán con descriptores numéricos del 0 al 10, y en los extremos se indicará ningún dolor (0) y máximo dolor (10).
- Reactantes de fase aguda: se recomienda la determinación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y de la proteína C reactiva (PCR)).

- Evaluación de la capacidad funcional: se recomienda evaluar la función física autopercebida mediante cuestionarios validados. El HAQ (*Health Assessment Questionnaire*) se desarrolló en 1980 como una medida específica de la discapacidad funcional de pacientes con AR y es el cuestionario más utilizado en estudios poblacionales y en la práctica clínica en la AR [52]. Consta de 20 ítems que se puntúan en una escala de 3 graduada en pasos de 0.125. Se considera que un cambio de dos pasos en la escala, es decir, una variación de 0.25 puntos equivaldría a un cambio real o clínicamente significativo.

- Valoración del daño estructural: se recomienda realizar una exploración radiológica que incluya manos y pies anualmente durante los primeros 3-4 años o cuando se inicie tratamiento con un agente biológico.

- Valoración de la calidad de vida relacionada con la salud, a través de cuestionarios validados.

- Índices de Actividad:

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

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

El índice más comúnmente utilizado para medir la actividad de la AR es el DAS y su derivado el DAS28 y ha demostrado ser adecuado para la práctica clínica y relevancia en la medición de la actividad de la enfermedad y su progresión [53]. El índice DAS para AR fue originalmente desarrollado a comienzos de los años 90 por van Der Heijde et al [54], basándose en el índice articular de Ritchie [55] que incluye 44 articulaciones dolorosas y tumefactas, la VSG y la VGP.

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

EL índice DAS28 es una simplificación del DAS original, en el que se evaluaban 44 articulaciones. Incluye la evaluación del NAD y NAT sobre recuento de 28 articulaciones, la valoración global del paciente y la VSG. También puede calcularse utilizando el valor de PCR en mg/dl en lugar del valor de la VSG). La puntuación tiene un rango de 0 a 11, siendo 0 la ausencia de actividad y el 11 la máxima actividad.

Para su cálculo se usa la siguiente fórmula:

$$\text{DAS28} = 0,56 (\text{VNAD28}) + 0,28 (\text{VNAT28}) + 0,70 (\text{In VSG}) + 0,014 (\text{VGP})$$

Recientemente se ha propuesto otro índice similar, el SDAI [56] que deriva de un índice desarrollado para la valoración de la actividad de las artritis reactivas. El SDAI utiliza una fórmula matemática más simple que la utilizada para el DAS28. Se calcula mediante una simple suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, la VGM, la VGP y la concentración de PCR, medida en mg/dl.

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

Actualmente la SER recomienda los índices DAS28 y SDAI para su uso en la práctica clínica.

En la Tabla 1 se presentan los diferentes grados de actividad de la enfermedad, considerando los diferentes índices descritos anteriormente.

Tabla 1. Puntos de corte para las categorías de actividad según los índices DAS, DAS28 y SDAI

	Categoría	Definición
DAS	Remisión	<1,6
	Actividad baja	<2,4
	Actividad moderada	2,4 < DAS28 < 3,7
	Actividad alta	$\geq 3,7$
DAS28	Remisión	<2,6
	Actividad baja	<3,2
	Actividad moderada	3,2 < DAS28 < 5,1
	Actividad alta	$\geq 5,1$
SDAI	Remisión	<5
	Actividad baja	<20
	Actividad moderada	20 < SDAI < 40
	Actividad alta	≥ 40

- Definición de remisión

La remisión clínica representa una ausencia de actividad de la enfermedad. A nivel práctico, la remisión clínica se define como la ausencia completa de actividad de la enfermedad o un nivel de actividad de la enfermedad tan baja que no es molesto para el paciente y que augura un buen pronóstico. Los criterios para la definición de remisión que el comité de expertos del ACR y del EULAR consensuaron en 2012 para su uso en ensayos clínicos en pacientes con AR se presentan en la Tabla 2 [57].

Tabla 2. Nuevos criterios del ACR/EULAR de remisión clínica de la Artritis Reumatoide

Definición categórica (hay que cumplir todos los criterios)

- 1.- Articulaciones dolorosas ≤ 1
- 2.- Articulaciones tumefactas ≤ 1
- 3.- PCR ≤ 1 mg/dl
- 4.- Valoración de la actividad por el paciente ≤ 1 (escala de 0-10)

Definición basada en un índice

SDAI ≤ 3

- Criterios de respuesta clínica

En las enfermedades crónicas como la AR es necesario valorar la respuesta al tratamiento, por lo que se han desarrollado herramientas que puedan evaluar cambios en la actividad de la enfermedad. Para AR, tanto en los ensayos clínicos como en la práctica clínica, se han utilizado multitud de medidas que hacían muy difícil la comprensión y la homogeneización de los resultados [58]. Para dar consistencia y uniformidad, tanto ACR como EULAR crearon unos criterios con aplicación a la práctica diaria y en los ensayos clínicos.

Los índices integran varias medidas en un único valor que las representa. Al combinar variables clínicamente importantes, se aumenta la consistencia de la evaluación entre situaciones diferentes y se aumenta el poder de discriminación, lo que permite reducir la muestra. En cambio, tienen la dificultad de su comprensión, o lo que es lo mismo, cómo y por qué se unen unas variables y no otras, y el método empleado para determinar su peso, ya que en los índices no todas las variables tienen el mismo efecto en el resultado final [59].

A) Respuesta EULAR

El criterio EULAR se calcula utilizando el índice DAS y su modificación, el índice DAS28, clasificando la mejoría en: ausente, moderada y buena. Para el uso de estos criterios no sólo es necesaria una mejoría sustancial del índice DAS28, que se define como un cambio de 1,2 puntos desde la semana basal a un tiempo determinado de la evolución de la enfermedad, sino que también es importante considerar el grado de actividad del paciente después del tratamiento (alto, moderado o bajo) [60]. Así, una mejoría del $DAS > 1,2$ con un DAS actual $< 2,4$ o $< 3,2$ utilizando el índice DAS28, se considera una respuesta “buena”. Una disminución del DAS28 menor de 1,2 y mayor de 0,6 con un DAS actual menor a 3,7 o menor a 5,1, es una respuesta “moderada”. Una respuesta insatisfactoria o “ausente” (no respuesta) se considera aquel paciente que no cumple ninguno de los criterios anteriormente descritos tal y como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Definición de la respuesta EULAR

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

B) Respuesta ACR

Los criterios de mejoría propuestos por el ACR son ampliamente utilizados en la práctica clínica. Estos criterios fueron elaborados por Felson en el año 1995 y valoran la respuesta terapéutica, pero no miden valores absolutos de actividad, sino sus cambios porcentuales.

Una mejoría ACR20 requiere una mejoría de, al menos, un 20% en el número de articulaciones dolorosas y tumefactas y al menos una reducción del 20% en 3 de las 5 variables restantes valoradas, tal y como se presenta en la tabla 4. Una respuesta ACR50, 70 o 90 requieren al menos una reducción del 50, el 70 o el 90%, respectivamente [61].

Tabla 4. Criterios de respuesta ACR20

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

El principal inconveniente de estos criterios es que no consideran el grado de actividad de la enfermedad actual por lo que la guía de práctica clínica para el manejo de pacientes con AR de la SER [62] propone agregar a estos criterios la siguiente consideración: Se considera Respuesta satisfactoria en aquellos pacientes que cumplan los criterios ACR20, siempre que presenten menos de 6 articulaciones tumefactas y ausencia de afectación en cualquier circunstancia del paciente que produzca pérdida intolerable de la capacidad funcional en opinión del paciente o del médico. Se considera Respuesta insatisfactoria el no cumplimiento de los criterios de respuesta satisfactoria.

8. Fármacos Anti-TNF- α

Aproximadamente un tercio de los pacientes con AR no responden al tratamiento convencional con DMARDs, por lo que deben recibir alguna terapia biológica. En 1997 se introdujeron nuevos tratamientos para la AR, que específicamente bloquean al TNF- α [63]. Durante la última década, la terapia con fármacos con acción anti-TNF α se ha convertido en la alternativa terapéutica más utilizada por los reumatólogos para el tratamiento de la AR. Actualmente, existen cinco agentes anti-TNF- α aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Agencia americana, la FDA (del inglés “*Food and Drug Administration*”), que se distinguen principalmente por su estructura, dosis y vías de administración: Infliximab (IFX), Etanercept (ETA), Adalimumab (ADA), Golimumab (GLM) y Certolizumab (CZP).

El uso de este tipo de fármacos deriva de un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la patogénesis de la enfermedad, por lo que, al ser tratamientos más específicos, son más eficaces y actualmente se considera que menos tóxicos que los DMARDs tradicionales. Los fármacos anti-TNF α son claramente eficaces para el tratamiento de los pacientes con AR activa, moderada o grave. Su eficacia es aún más notoria cuando se trata de una enfermedad refractaria al MTX [64].

Aunque no existen estudios que comparen directamente los fármacos entre sí, en general los datos de los estudios pivotaes y de práctica clínica señalan que la eficacia y el perfil de seguridad es similar entre ellos. Así, por ejemplo, datos de la cohorte de pacientes del estudio CORRONA (CONsortium of Rheumatology Researchers Of North America) [65], en el que se incluyeron 2.242 pacientes con AR en tratamiento con IFX, ETA y ADA, no mostraron diferencias significativas en las tasas de respuesta entre los diferentes fármacos incluso en la

remisión. En este mismo estudio sin embargo se observó que entre los tres anti-TNF α , el IFX se asoció con una mayor supervivencia del fármaco.

A) Estructura molecular de los fármacos bloqueadores del TNF α

La estructura del infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab y certolizumab están representadas de forma esquemática en la Figura 5. Todos los agentes, excepto el ETA, son anticuerpos monoclonales (mAbs) o fragmentos de los mismos. Los mAbs obtenidos de las células B; mediante la clonación expresan copias de una única cadena pesada (H) y una única cadena ligera (L) que se unen covalentemente para formar una molécula de anticuerpo de especificidad única. El mAb de ingeniería puede ser estructuralmente idéntico al mAb natural pero se desarrolla a partir de la mutación del gen, imitando los procedimientos naturales [66].

La estructura y mecanismo de acción de cada uno de los fármacos inhibidores del TNF α se representa en la figura 8 y se describe a continuación [67]:

- Infliximab (Remicade[®]) es un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1, de aproximadamente 149 kDa que se compone de una región humana constante (75%) y una variable murina (25%). El IFX se une específicamente al TNF α humano con alta afinidad y neutraliza la actividad biológica de esta citoquina al inhibir la unión a sus receptores.

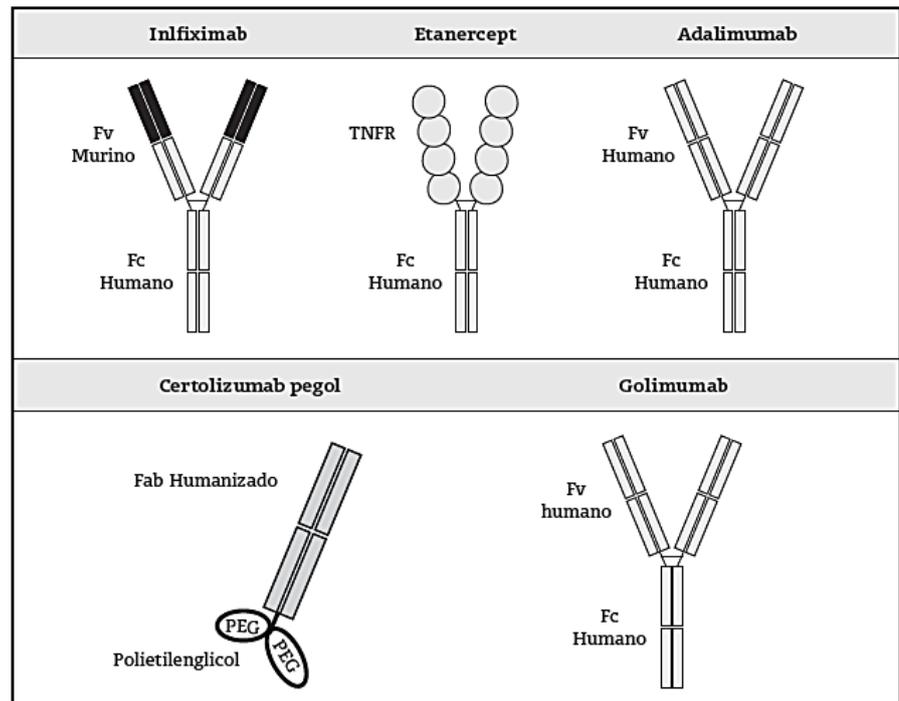
- Etanercept (Enbrel[®]) es una proteína dimérica de fusión de aproximadamente 150 kDa, que bloquea la parte extracelular de los receptores p75 del TNF vinculada a la porción Fc de la IgG1 humana. El ETA bloquea no solo la acción del TNF- α sino también la acción de la linfotoxina o TNF β mediante su interacción con el receptor del TNF en la superficie celular.

- Adalimumab (Humira[®]) es un anticuerpo recombinante monoclonal completamente humano de aproximadamente 148 kDa que actúa inhibiendo el TNF α humano. Al igual que el IFX, el adalimumab (ADA) no neutraliza el TNF β .

- Golimumab (Simponi[®]) es un anticuerpo monoclonal humano con acción anti-TNF α . Se asemeja al ADA ya que es un anticuerpo monoclonal completamente humano. Sin embargo, el golimumab (GLM) también se asemeja al IFX por las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas.

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

Figura 8: Diagrama simplificado de la estructura de los 5 tratamientos anti-TNF α . Tomado de Tracey y cols. *Pharmacology & therapeutics*. 2008; 117(2): 244-79 [66]



Fc: fracción constante de IgG , Fv: fracción variable, TNFR: dominio extracelular del receptor del TNF p75.

B) Indicaciones y datos de eficacia

- Infliximab

IFX ha sido aprobado por la EMA para el tratamiento de pacientes con AR activa que hayan mostrado una respuesta inadecuada a DMARDs, incluyendo el MTX. También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la psoriasis. En pediatría está indicado para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [68]. Se administra por vía intravenosa a dosis que varían de acuerdo con la enfermedad y la respuesta clínica. En la AR se utiliza en asociación

con MTX, generalmente a una dosis de 3 mg/kg en las semanas 0, 2, 6 y posteriormente cada 8 semanas.

En relación a la eficacia del IFX en la prevención del daño articular, el estudio ATTRACT (*Anti-TNF Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy*), demostró que IFX a dosis de 3 mg/kg combinado con MTX inhibe tanto las erosiones como el estrechamiento del espacio articular en forma más eficiente que el MTX en monoterapia [69]. Estos datos coinciden con los resultados del estudio ASpiRE (*Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset*) que indican que la combinación de IFX y MTX reduce la progresión del daño estructural, especialmente en la etapa temprana de la enfermedad [70].

La eficacia de IFX en los diferentes ensayos clínicos se ha estudiado en un meta-análisis que incluyó 2.129 pacientes procedentes de 6 estudios clínicos randomizados. Se evaluó la respuesta ACR entre las 14 y las 30 semanas de tratamiento con IFX combinado con MTX, en comparación con el placebo en combinación con el MTX. En el grupo tratado con IFX en relación al grupo control, el riesgo relativo (RR) de alcanzar la respuesta ACR20 fue de 1,87 (59% de los pacientes tratados con IFX vs 31 % de los pacientes en el grupo control). La respuesta ACR50 se observó con un RR de 2.68 (33% de los pacientes tratados con IFX vs 12% de los pacientes en el grupo control) y el RR de alcanzar la respuesta ACR70 fue de 2.68 (17% de los pacientes tratados con IFX vs 5 % de los pacientes del grupo control) [71].

- Etanercept

ETA está aprobado por la EMA para el tratamiento en adultos con AR moderada a grave en combinación con MTX en pacientes con respuesta inadecuada al tratamiento con otros DMARDs. También puede utilizarse en pacientes con AR grave que no hayan utilizado MTX previamente. Asimismo, también está indicado para el tratamiento de la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante y la psoriasis; y en niños, para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil [72]. Se administra por vía subcutánea y se absorbe lentamente desde el lugar de la inyección. La dosis utilizada es de 50 mg/ semana. ETA puede administrarse en monoterapia. Sin embargo, el MTX se emplea con frecuencia de forma concomitante para mejorar la eficacia del tratamiento y mantener la respuesta clínica a la inhibición del TNF α .

Varios ensayos clínicos han demostrado la eficacia y seguridad de ETA. En el estudio TEMPO [73] (*Trial of Etanercept and Metotrexate with radiographic Patients Outcomes*) se

evaluó la eficacia del ETA en monoterapia y de la combinación con MTX en 689 pacientes con AR. Observaron que a los 12 y 24 meses los pacientes tratados con ETA en combinación con MTX, presentaban una mejoría significativa, con reducción de la actividad de la enfermedad, una mejoría en la calidad de vida y una reducción de la progresión del daño radiológico con respecto a los pacientes tratados con ETA o con MTX en monoterapia.

- Adalimumab

ADA fue aprobado por la EMA en el año 2003 para el tratamiento en adultos de la AR moderada a grave que no hayan respondido adecuadamente a otros DMARDs. Puede utilizarse en pacientes con AR grave que no hayan utilizado MTX previamente. También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, la artritis psoriasica, la enfermedad de Crohn, la psoriasis y en los niños para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil [74]. La dosis recomendada de ADA es de 40 mg cada dos semanas por vía subcutánea.

En relación a los ensayos clínicos que han probado su eficacia el estudio PREMIER [75], un estudio multicéntrico, randomizado, doble ciego que evaluó la eficacia de la terapia combinada de ADA más MTX frente a MTX sólo o ADA sólo en pacientes con AR precoz agresiva que no habían tenido tratamiento previo con MTX, concluyó que los pacientes con AR precoz (duración de la enfermedad menor a tres años) que fueron tratados durante seis meses con un tratamiento combinado de ADA y MTX, presentaron una progresión radiográfica significativamente menor que los pacientes tratados con MTX en monoterapia. En el estudio ARMADA [76] se evaluó la eficacia a largo plazo de ADA más MTX y se utilizó ADA en monoterapia y combinado con MTX comparado con placebo + MTX. En relación a la eficacia, tanto en la terapia combinada como en la monoterapia, el ADA se asoció con mejoría significativa en cuanto a las respuestas ACR20, ACR50 y ACR70 con respecto al grupo placebo combinado con MTX. También se observó una reducción significativa de la progresión radiológica del daño estructural.

En el estudio STAR (*The Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis*) [77] se evaluó la eficacia del ADA en combinación con otros DMARDs tradicionales diferentes al MTX. Comparando con el grupo placebo, la adición de ADA al tratamiento de la AR consiguió una mayor respuesta ACR 20, ACR 50 y ACR 70 en la semana 24 de tratamiento. El estudio STAR fue el primer estudio realizado para evaluar la eficacia de un anti-TNF α con otros DMARDs tradicionales diferentes al MTX.

- Golimumab

GLM tiene la aprobación de la EMA para el tratamiento de la AR moderada y grave en combinación con el MTX en pacientes que no hayan respondido adecuadamente a otros DMARDs. También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante y la artritis psoriasica [78]. Se administra en forma de inyección subcutánea a dosis de 50 mg cada cuatro semanas.

La eficacia del tratamiento con GLM en pacientes con AR se ha investigado principalmente en tres ensayos clínicos, con diferentes poblaciones de pacientes. En el estudio Go-Forward en pacientes traados previamente con MTX (*GOLimumab FOR subjects With Active RA Despite MTX*) se incluyeron pacientes con una respuesta inadecuada al MTX. En este estudio se observó que los pacientes tratados con GLM y MTX alcanzaban una mejor respuesta en comparación con los pacientes que recibían MTX en monoterapia, aunque no se objetivó una mayor eficacia cuando se comparó con el grupo de pacientes que recibían GLM en monoterapia [79].

En el estudio Go- Before en pacientes naive (*Golimumab for subjects MTX-naive With Active RA*) se utilizó el fármaco como primera línea (pacientes que no han recibido previamente otra terapia anti-TNF- α ni MTX) en combinación con MTX y se observó que los pacientes que recibían GLM en combinación con MTX alcanzaban una mayor eficacia en comparación con el grupo que recibía MTX en monoterapia [80].

En el estudio Go-After en pacientes que habían fallado an tratamiento con antiTNF- α (*Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis After treatment with tumour necrosis factor α inhibitors*), se observó que el GLM puede ser eficaz en pacientes que hayan sido tratados con algún otro fármaco con acción anti-TNF α y que hayan presentado una respuesta inadecuada [81].

- Certolizumab

En el año 2009 la EMA aprueba el CZP en combinación con MTX, para el tratamiento de pacientes adultos con AR activa de moderada a grave cuya respuesta a DMARDs, incluyendo el MTX, ha sido inadecuada. Puede ser administrado en monoterapia en caso de intolerancia a MTX o si el tratamiento continuado con MTX resulta inapropiado [82]. La dosis de CZP es de 400 mg en las semanas 0, 2 y 4, seguido de una dosis de mantenimiento de 200 mg cada 2 semanas.

La evidencia que apoya el uso de CZP en el tratamiento de AR deriva de tres ensayos pivotaes realizados en pacientes con AR activa (moderada o grave). Dos de estos estudios, el

RAPID1 (*RA Prevention of structural Damage 1*) [83] y el RAPID2 (*Rheumatoid Arthritis Prevention of structural Damage 2*) [84] evalúan pacientes que habían tenido una respuesta incompleta al tratamiento con MTX los 6 meses previos al estudio. En ambos estudios se observaron mejorías significativas tanto en la respuesta clínica como en la reducción de la progresión radiográfica a la semana 24 en el grupo tratado con CZP en combinación con MTX vs el grupo que recibió placebo en combinación con MTX.

El tercer estudio fue el FAST4WARD (*eFficAcy and Safety of cerTolizumab pegol –4 Weekly dosAge in RheumatoiD arthritis*) cuyo objetivo fue investigar la eficacia de CZP en monoterapia. En este estudio se observó que los pacientes que recibían CZP alcanzaban con más frecuencia la respuesta ACR20, ACR50 en comparación con el grupo placebo a las 24 semanas de tratamiento [85].

9. Respuesta inadecuada a fármacos antiTNF- α

Los fármacos antiTNF- α descritos se han mostrado muy eficaces en ensayos clínicos aleatorizados con pacientes con AR activa a pesar del tratamiento con DMARDs clásicos y tienen un comienzo de acción más rápido e intenso. Aunque no existen ensayos en los que se comparen directamente entre ellos, las comparaciones indirectas indican que no existen diferencias sustanciales en cuanto a eficacia, y consiguen en cerca del 70% de las pacientes mejorías ACR20, dato que se confirma en los trabajos prospectivos de cohortes que comparan estos agentes y en los que tampoco se describen diferencias importantes entre ellos [86]. Sin embargo, en pacientes con enfermedad establecida, un 30-40% de los pacientes no responden a los antagonistas del TNF- α , bien por falta de eficacia del producto, bien por aparición de efectos secundarios que obligan a su interrupción, y la mayoría de los pacientes que responden no logran alcanzar niveles de actividad bajos o remisión.

Aunque los tres fármacos actúan bloqueando el TNF- α , hay diferencias en su mecanismo de acción y su estructura molecular que, en casos determinados, puede explicar la diferente respuesta y el hecho de que el fallo a uno de ellos no presupone el fallo a otro, aunque no hay evidencias directas que respalden esta afirmación.

El fallo al bloqueo del TNF α puede ser por 4 motivos diferentes. La primera posibilidad es que el paciente no responde nada. La medida de la respuesta se evalúa según el cambio de actividad de la enfermedad, que puede ser porcentual o absoluta, por lo que es necesario objetivarla de manera precisa. Los criterios de mejoría del ACR valoran la respuesta terapéutica, pero no miden cambios absolutos de actividad, sino cambios porcentuales. Una

mejoría ACR20 requiere una mejoría de, al menos, un 20% en el número de articulaciones dolorosas e inflamadas y al menos una reducción del 20% en 3 de las 5 variables que componen el core set de medidas. Un ACR50, ACR70 o ACR90 requieren, al menos, reducciones del 50, el 70 o el 90%, respectivamente. Sin embargo, un paciente con una mejoría ACR puede no tener una respuesta clínicamente satisfactoria. Por ejemplo, si un paciente tiene 20 articulaciones dolorosas e inflamadas antes del tratamiento y se consigue una reducción del 50% que es clínicamente significativa, tendrá 10 articulaciones dolorosas e inflamadas, lo que es clínicamente insuficiente. Si a esto unimos su complejidad de cálculo, comprenderemos por que no son útiles en la clínica diaria [61]. Como se ha comentado previamente, el índice DAS y su modificación, DAS28, son los índices en que se basan los criterios de mejoría de la EULAR y clasifican la mejoría en ausente, moderada y buena [60]. Para el uso de estos criterios no sólo hace falta una mejoría sustancial del DAS, que se define como 1,2 al ser el doble del error de la media, sino que es importante el grado de actividad en que queda el paciente después del tratamiento (alta, moderada o baja). Para su uso se construye una tabla de doble entrada. La mejoría, según los criterios EULAR (buena y moderada), tiende a ser ligeramente mayor que la del ACR20, y la mejoría buena es mayor que el ACR50, pero ambos criterios se comportan de forma apropiada cuando se utilizan en ensayos clínicos, los que no necesariamente significa que sean igual de útiles en la práctica clínica [87,88].

El segundo motivo de no respuesta a antiTNF α es la pérdida secundaria de eficacia, es decir, los pacientes que responden al principio, pero con el tiempo van empeorando y en ocasiones, pese a incrementar la dosis del fármaco. Este tipo de fallo se ha relacionado con la aparición de anticuerpos contra el fármaco; dado que las diferencias estructurales entre los agentes influyen en su inmunogenicidad, se justificarían un cambio de agente antiTNF α . Las proteínas derivadas del ratón tienden a ser más inmunógenas que las humanas, ya que son diferentes de éstas. Los anticuerpos quiméricos producen anticuerpos contra la parte murina (HAMA, del inglés *Human Anti-Mouse Antibody*), mientras que los humanos desarrollan con menos frecuencia anticuerpos antihumano (HACA, del inglés *Human Anti-Human Antibody*). ETA puede producir el desarrollo de anticuerpos contra la unión del receptor soluble con la inmunoglobulina, aunque son menos frecuentes [89]. Los anticuerpos pueden ser neutralizantes, si se unen al fármaco y evitan que actúe, o no neutralizantes. El fármaco más inmunógeno parece ser IFX, seguido de ADA; ETA parece que produce una muy baja tasa de anticuerpos, que son no neutralizantes.

El tercer motivo de fallo de un antiTNF- α es que el paciente responda de manera conveniente pero aparezcan efectos adversos que obliguen a suspenderlo. Los efectos adversos pueden estar relacionados con el fármaco, como los dependientes de la ruta de administración, o con su mecanismo de acción, como es la aparición de infecciones.

El último tipo de fallo es probablemente el más frecuente desde el punto de vista clínico, y es el fracaso terapéutico parcial. En Biología, la respuesta a un fármaco no es dicotómica (responde o no responde), sino que tiene una distribución gaussiana, y este tipo de respuesta es el que se ha descrito con los antiTNF- α [90]. Esto significa que la mayoría de los pacientes no tiene una respuesta excelente ni o entran en remisión o no responden, sino que tiene respuestas que se pueden clasificar como moderadas. En los ensayos clínicos, la frecuencia de mejorías parciales es útil para comparar dos fármacos, pero en la práctica clínica pueden ser insuficientes [91].

10. Biomarcadores en AR

Desde la introducción de las terapias biológicas en el tratamiento de la AR el pronóstico de esta enfermedad ha cambiado de forma considerable. No obstante, y como acabamos de exponer, aproximadamente un 30% de los pacientes con AR no responden a estos tratamientos [92]. Hasta el momento no existe ningún biomarcador validado que pueda ser utilizado como un predictor de respuesta en la práctica clínica y tampoco se conoce bien el mecanismo biológico por el cual algunos pacientes no responden a estos tratamientos.

Un biomarcador es un parámetro molecular, anatómico, fisiológico o bioquímico, o una característica de imagen que puede ser usada para el diagnóstico, medida de la progresión o monitorización de tratamiento en una enfermedad. También pueden asociarse a la severidad de estados específicos de la enfermedad. Los biomarcadores pueden ser detectados y medidos por gran cantidad de métodos, incluyendo examen físico, test de laboratorio o pruebas de imagen. Algunos biomarcadores están presentes en un grupo particular de pacientes, pero no en otros, siendo definidos como biomarcadores cualitativos. Por el contrario, los biomarcadores cuantitativos están presentes en varios grados o niveles en todos los pacientes. La accesibilidad de un biomarcador biológico, que se define como los métodos que se usan para acceder al biomaterial necesario para medirlo, es un factor muy importante en relación con su adopción en la práctica clínica. Si un biomarcador puede obtenerse de forma mínimamente invasiva (típicamente, sangre, saliva u orina) o es una técnica de imagen en lugar de una muestra de tejido, obviamente será más atractivo [93].

En el contexto de la AR, los biomarcadores biológicos típicos pueden incluir marcadores genéticos, productos de la expresión de genes, autoanticuerpos, citoquinas, reactantes de fase aguda, anomalías de los tejidos visualizadas por inmunohistoquímica en biopsia sinovial, un producto de degradación celular o un subtipo celular que puede ser fenotipado. Las fuentes de estos biomarcadores podrían ser suero o plasma, orina, líquido sinovial, biopsia de tejido o células de la sangre, ganglios linfáticos o tejido. Por el contrario, un biomarcador clínico podría constituir una variable física, signo o síntoma, un juicio clínico o una medida de resultado que refleja el proceso de la enfermedad. Puede ser no sólo el contaje articular, la valoración global, las escalas de dolor, la duración de la rigidez matinal y otras variables clínicas, sino también índices compuestos o funcionales y escores radiológicos.

La sensibilidad y la especificidad son medidas estadísticas que relacionan las propiedades del biomarcador. La sensibilidad se relaciona con la capacidad del biomarcador de identificar resultados positivos, es decir, la proporción de individuos que son correctamente identificados. La especificidad es la capacidad que tiene para identificar resultados negativos, esto es, la proporción de personas sin el biomarcador que son correctamente no identificados por el mismo. La proporción de pacientes actuales positivos en la población testada es el valor predictivo positivo.

Un biomarcador óptimo debería alcanzar una sensibilidad del 100% (predice todas las personas con tal condición) y una especificidad de 100% (no incluye a ningún sujeto del grupo control). Para cualquier biomarcador existen habitualmente unos límites aceptables en relación a la medida y su impacto, permitiendo la detección de falsos positivos a costa de una más baja especificidad, pero limitando los falsos negativos (mayor sensibilidad). Por ejemplo, los anti-CCP en AR tienen una sensibilidad de alrededor de un 68% y una especificidad de 95%. Es decir, son buenos para realizar un diagnóstico preciso pero pueden perderse pacientes, teniendo en cuenta, además, que la sensibilidad depende en gran medida de la población sobre la que se apliquen, ya que hay que tener en cuenta tasas de sensibilidad para los anti-CCP observadas en AR establecida suelen ser más altas que en formas iniciales [94].

Muchas situaciones en AR pueden beneficiarse de la aplicación de biomarcadores, considerando que los biomarcadores pueden ser ampliamente clasificados como diagnósticos (detectan cuándo la enfermedad está presente), pronósticos (asociados con el resultado de la enfermedad) o biomarcadores predictores (asociado con la respuesta a fármacos). El estudio de la fisiopatología de la AR ha permitido el desarrollo de fármacos capaces de actuar de forma precisa en las vías relacionadas con el proceso inflamatorio. Sin

embargo, como se ha comentado previamente, existe un porcentaje de pacientes en los que estas terapias no son eficaces. Hasta el momento no existe ningún biomarcador validado que pueda ser utilizado como un predictor de respuesta en la práctica clínica y tampoco se conoce con exactitud el mecanismo biológico por el cual algunos pacientes no responden de forma adecuada a estos tratamientos. La capacidad de predecir qué pacientes responderán a un tratamiento determinado permitiría optimizar el tratamiento con estos agentes. Por tanto, la búsqueda de biomarcadores pronósticos que puedan predecir el curso de la enfermedad y proporcionen información sobre posible respuesta a tratamiento es un reto importante, dado que pueden ayudar al clínico a predecir la evolución de artritis indiferenciadas a AR, o a pronosticar la severidad de la AR, la cual presenta gran variabilidad. Podrían asimismo ayudar a identificar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de complicaciones, evolución más rápida o peor respuesta al tratamiento, lo cual permitiría realizar intervenciones más precoces, tratamiento más intensivo o identificar grupos de pacientes que pueden responder mejor a una terapia que otra. Todo ello representaría un paso esencial en el manejo de los pacientes con AR, sobre todo en pacientes de reciente inicio, permitiendo crear un modelo de medicina personalizada orientada a un mejor manejo del enfermo junto a una mejora en los costes y el análisis del riesgo-beneficio de los fármacos, consiguiendo la más alta tasa de respuesta con la mínima toxicidad [95]. Por todo ello, la identificación de predictores de respuesta a tratamientos clínicos y biológicos es clave para la tipificación precoz de pacientes que se beneficiaran de dichas terapias.

Entre los biomarcadores identificados hasta el momento como posibles factores pronósticos en pacientes con AR, se muestran a continuación los más relevantes:

A) Biomarcadores clínicos

Varios estudios que evalúan la influencia de las características epidemiológicas en la evolución clínica de pacientes con AR han encontrado que factores como el género y la edad pueden ser factores predictores de respuesta terapéutica.

Existen datos de que las mujeres presentan un peor curso de la enfermedad a pesar de recibir el mismo tratamiento y que la respuesta al tratamiento con antiTNF α podría ser mejor en pacientes varones en formas de AR de reciente inicio, no así en la AR establecida [96,97,98].

Respecto a la edad, aunque existen datos contradictorios, algunos trabajos han encontrado que puede jugar un papel como predictor de respuesta al tratamiento. Burmester y cols. [92] objetivaron que los pacientes mayores de 40 años alcanzaban menos la remisión a 3 años.

Ya se ha comentado la influencia del tabaco en la susceptibilidad de desarrollar AR. También ha sido estudiado el hábito tabáquico como factor predictor de respuesta al tratamiento. Un estudio ha sugerido que los pacientes con AR que fuman tienen una necesidad de recibir mayor número de DMARDs, de forma que la eficacia de estos agentes antirreumáticos puede estar reducida en pacientes fumadores [99]. Específicamente en relación a los fármacos anti-TNF- α , Hyrich y cols. [96] observaron una asociación estadísticamente significativa entre el hábito de fumar y una menor respuesta al tratamiento con IFX. Varias razones pueden explicar esta asociación: a) la relación bien establecida entre el hábito tabáquico y el incremento en la producción del FR y de anticuerpos anti-CCP; b) la posible asociación del tabaco con el incremento en la producción de anticuerpos antiquméricos o anticuerpos HACA, que disminuyen la respuesta al tratamiento [100]; c) la alteración de la farmacocinética del anti-TNF α en los pacientes fumadores, de modo que, por un lado podría interferir en la absorción de estos fármacos y por otro es posible que los fumadores tengan altas concentraciones en suero de TNF α así como de otros mediadores inflamatorios que predispongan a una mayor resistencia a la terapia con anti-TNF α . Existen asimismo evidencias de que determinadas citoquinas y metaloproteasas de matriz están elevadas en los pacientes fumadores [101].

En relación a los predictores clínicos relacionados con la actividad de la enfermedad, factores como el uso concomitante de MTX y el bajo HAQ al inicio del tratamiento se han sugerido como predictores de buena respuesta al tratamiento con antiTNF- α [96, 97, 102]. Varios estudios coinciden en que la actividad de la enfermedad medida por el índice DAS28 al inicio del tratamiento con DMARDs es un factor pronóstico muy importante para alcanzar la remisión. Verstappen et al [103] observaron que aquellos pacientes con un menor número de articulaciones dolorosas y tumefactas a la semana de tratamiento con diferentes DMARDs tienen una mayor probabilidad de alcanzar la remisión. Así mismo en el registro Alemán de terapias biológicas, RABBITS [104] (*acrónimo alemán para Rheumatoid Arthritis-Observation of Biologic Therapy*) se observó que los pacientes con un DAS28 menor a 5,1 de forma previa al tratamiento tenían mayores tasas de remisión (30%) definida por el índice DAS28 en comparación a los que presentaban al inicio del tratamiento un DAS28 mayor a 6 (8.5%).

Keystone et al [105] realizaron un subanálisis de los estudios TEMPO [73] (*Trial of Etanercept and Methotrexate With Radiographic Patient Outcomes*) y ERA [106] (AR precoz, del inglés *Early Rheumatoid Arthritis*) y observaron que, en general, los pacientes con moderada actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento con anti-TNF- α alcanzaban una mejor respuesta a los 6 meses con respecto a los pacientes con elevados índices de actividad en la semana basal. Aletaha et al [107], concluyeron que la actividad de la enfermedad medida por los índices SDAI, DAS28 o CDAI antes del inicio del tratamiento con anti-TNF α y sobre todo al mes de iniciado el tratamiento, está significativamente asociada a la actividad de la enfermedad al año de seguimiento.

El número de DMARDs previo al inicio del tratamiento anti-TNF- α también ha sido estudiado como posible biomarcador de respuesta al tratamiento. En este sentido se ha publicado un estudio observacional en una cohorte transversal que incluyó a 111 pacientes con AR que estaban siendo tratados con un fármaco anti-TNF- α y se analizaron los factores predictores de remisión. Se observó que el número de DMARDs previos era inversamente proporcional a la tasa de remisión en estos pacientes [108]. Este trabajo coincide con el registro británico [96], pero difiere de lo publicado por Burmester et al [92], ya que estos últimos autores no observaron una asociación significativa entre el número de FAMEs previos y la remisión clínica en respuesta al anti-TNF- α .

B) Biomarcadores serológicos

La relación del FR y de los anticuerpos anti-CCP con el fenotipo y el pronóstico de la AR es bien conocida; sin embargo, los datos relativos a la influencia de estos marcadores sobre la respuesta terapéutica son más limitados. El FR es reconocido ampliamente como un marcador de mal pronóstico, así como la presencia de anti-CCP. Varios estudios han encontrado que la presencia de FR y anti-CCP se asocian a una menor respuesta al tratamiento y que los títulos de FR tienden a descender significativamente tras el tratamiento, mientras que los de anti-CCP no se modifican [109].

Respecto a otros marcadores serológicos de respuesta, algunos datos sugieren que los valores séricos reducidos al inicio del tratamiento anti-TNF- α de RANKL, así como del ratio RANKL/osteoprotegerina en pacientes con AR se asociaban a la remisión [110]. Otros marcadores serológicos como los valores elevados de Apolipoproteína A1 (principal componente de las lipoproteína de alta densidad o HDL) y los valores disminuidos de factor

plaquetario 4 (quimioquina específica de los gránulos plaquetarios) también parecen predecir una mejor respuesta [111].

La determinación en el suero de las concentraciones de TNF- α se presenta como un atractivo candidato de estudio para la identificación de biomarcadores de respuesta. Sin embargo, su determinación sistemática mediante ensayos de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es particularmente difícil, con un umbral muy bajo, cercano al límite de detección. No obstante, las concentraciones de esta citoquina en suero antes del inicio del tratamiento con anti-TNF- α no estuvieron en relación con la respuesta en un estudio francés que incluyó a 50 pacientes que recibían tratamiento con IFX [112]. Dado que la determinación del TNF α por ELISA no se demostró útil para predecir la respuesta, el mismo grupo francés llevó a cabo un estudio funcional del TNF- α circulante en 20 pacientes con AR. En este estudio se observó que las concentraciones elevadas del TNF- α circulante activo estaban asociadas a una buena respuesta al IFX, con un valor predictivo positivo del 90% [113].

Se ha estudiado también la correlación entre la respuesta terapéutica y las células *Th17* que secretan IL-17. Esta citoquina participa en la inflamación y destrucción de los tejidos por medio de la inducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y metaloproteasas de matriz. Este ha sido foco de atención de un estudio publicado por Chen et al [114] quienes observaron que el número de células *Th17* y la concentración de IL-17 en suero de pacientes con AR estaban elevadas en pacientes que no respondían adecuadamente al tratamiento con fármacos de acción anti-TNF- α . Se observó además que las concentraciones de IL-17 en la semana basal eran superiores en pacientes no respondedores en comparación con los respondedores a este tipo de tratamiento. Esta teoría es apoyada por otro estudio posterior en donde se señala que la respuesta al tratamiento con anti-TNF α estaba asociada a la concentración de *Th17*/IL-17 previa al inicio del tratamiento [115].

Respecto a otras citoquinas implicadas en la patogénesis de la AR, Wright et al [116] encontraron niveles significativamente más elevados de IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF y TNF α en pacientes con AR respecto a otras artritis inflamatorias, pero estas citoquinas no se modificaron en líquido sinovial de forma diferencial en función de la respuesta a la terapia. Los pacientes no respondedores al tratamiento con anti-TNF α presentaban valores significativamente más elevados en líquido sinovial de IL-6 previos a la terapia, mientras que en los pacientes respondedores encontraron niveles elevados de IL-2 y G-CSF. En el plasma, sin embargo, los niveles de citoquinas no fueron significativamente

modulados por el tratamiento con antiTNF- α (no predicen respuesta a antiTNF- α), excepto los niveles de IL-6 que descendieron después del tratamiento. En este estudio, el agrupamiento de citoquinas en líquido sinovial reveló 6 grupos de pacientes con patologías celulares subyacentes posiblemente diferentes, y concluyeron que los niveles de IL-6, IL-2 y G-CSF en líquido sinovial podrían ser útiles para predecir respuesta a antiTNF α . Otro trabajo publicado recientemente [117] ha encontrado que los niveles séricos de IL-6 están más elevados antes del tratamiento en pacientes no respondedores a Rituximab y que se reducen de forma significativa sólo en los pacientes respondedores, a pesar de una depleción adecuada de linfocitos B en los no respondedores.

C) Biomarcadores genéticos

Las variantes genéticas son estables en el tiempo, baratas y, lo más importante, no son consecuencia del tratamiento o la enfermedad, sino que están presentes antes de que se inicie el tratamiento. Un factor producido a consecuencia de un tratamiento podría reflejar una respuesta terapéutica, pero probablemente tendría limitada utilidad como biomarcador preventivo. Por tanto, los polimorfismos genéticos pueden ser claves para predecir resultados antes de una intervención. Además, numerosos estudios han investigado predictores genéticos de respuesta al tratamiento con MTX y fármacos antiTNF- α en pacientes con AR. Los loci con más evidencia en cuanto a asociación con respuesta terapéutica a antiTNF α son TNF ($_308G>A$), PTPRC (rs10910563; G>A, GD84 (rs6427528; G>A) y PDE3A-SLCO1C1 (rs3794271; C>T) [118].

Sin embargo, son escasas las evidencias sobre la asociación entre variantes genéticas y la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, los datos son contradictorios respecto a la relación de polimorfismos del gen de la metiltetradihidrofolato reductasa (MTHFR), enzima clave en la vía del folato, como predictor de respuesta al tratamiento con MTX o de toxicidad [119].

Sólo 2 asociaciones hasta la fecha han demostrado niveles de significación aceptables. Primero, variaciones en el gen CD84, que codifica el miembro 5 de la familia SLAM, han demostrado ser predictoras de respuesta a ETA [120]. En segundo lugar, el locus PDE3A-SLCO1C1 (que codifica la fosfodiesterasa A) se ha asociado con respuesta a ETA, IFX y ADA [121].

El primer estudio genético que valoró la respuesta a anti-TNF- α se llevó a cabo en 2008 [122]. Entre sus conclusiones destacaron la asociación del SNP2985 con cambios en el DAS28, del gen rs1800896 (alelo G) en el promotor de la IL-10 y del locus de la paraoxonasa

(PON1, enzima relacionada con lipoproteínas de alta densidad que parece tener un papel importante en la respuesta inflamatoria) con una buena respuesta a anti-TNF.

No existen datos que apoyen asociación entre la presencia del epítipo compartido y la respuesta al tratamiento con antiTNFalfa. Sin embargo, varios grupos de trabajo han encontrado que los pacientes con el genotipo IL-10-1087 G/G y TNF α _308 G/G (sujetos con respuesta inflamatoria baja) presentaron una mejor respuesta a ETA e IFX [123]. A pesar de todos estos estudios relativamente concordantes, un metaanálisis [124] que incluyó 13 estudios y 1.817 pacientes, concluye que ni el polimorfismo TNF α -308A/G ni los alelos del EC se asocian con respuesta a la terapia anti-TNF (ETN, IFX, ADA) y únicamente encuentra asociación entre el polimorfismo TNF α -238A/G y respuesta a IFX (asociación de alelo A con pobre respuesta).

Sin embargo, ninguno de estas asociaciones genéticas es suficientemente predictiva para influir en decisiones clínicas relacionadas con la selección de la terapia más apropiada para pacientes individuales.

EPIGENÉTICA

1. Concepto

Aunque la mayoría de las células posee la misma secuencia de ADN, la actividad de los genes individuales difiere significativamente entre diferentes tipos celulares y tejidos, dependiendo no sólo de la secuencia de nucleótidos del ADN, sino también de una gran diversidad de mecanismos reguladores. La epigenética (del griego epi, en o sobre, y genética) involucra todos los mecanismos no genéticos (no explicables debido a la secuencia del ADN) que dan lugar a una expresión genética diferencial, es decir, alteran la expresión génica y proteica y, por tanto, definen el fenotipo del organismo. Se podría definir como el estudio de los cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia y que modulan la expresión génica [125,126], e implican cambios heredables en el fenotipo. Hace referencia al estudio de los procesos que son la base del desarrollo en organismos tanto procariontas como eucariotas, incluidos los que se relacionan con la determinación y diferenciación celular, y las interacciones entre grupos de células que inducen un perfil fisiológico y morfológico. Una de las funciones más importantes de los cambios epigenéticos del genoma es que proveen mecanismos por los cuales un organismo puede responder al medio ambiente sin cambiar su secuencia del ADN. Es decir, los cambios

en la herencia epigenética implican modificaciones de la expresión génica, sin relacionarse con alteraciones del código genético, que se transmiten a una o más generaciones sucesivas, pudiendo afectar a la expresión de un gen o a las propiedades de su producto.

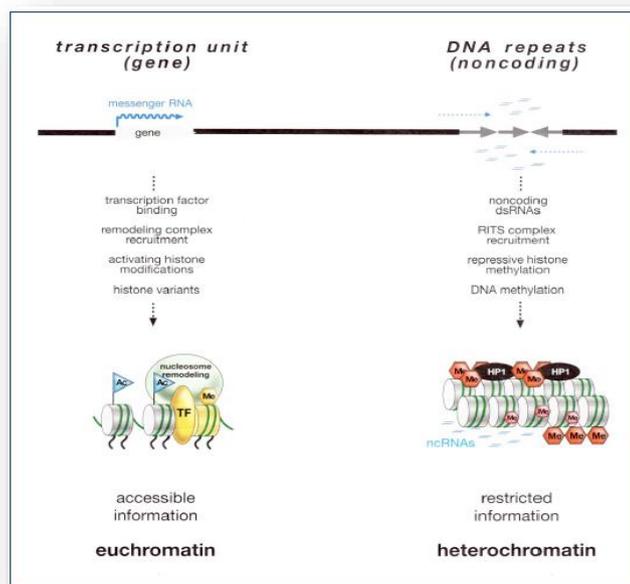
Es un proceso celular normal que regula la expresión de los genes; por lo tanto, regula de qué proteínas dispone la célula en cada momento. Esta regulación puede ser a corto o largo plazo; por ello, los mecanismos o sistemas de control epigenético establecen y mantienen los diferentes estados celulares y orgánicos. Se trata de procesos dinámicos que cambian bajo la influencia de factores endógenos y ambientales. La regulación de la actividad de un gen puede controlarse a nivel transcripcional, postranscripcional, mediante modificaciones postraduccionales, etc. Entre los mecanismos de regulación transcripcional se incluye el control ejercido por los factores de transcripción, que se complementa con la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas, entre otros mecanismos. A nivel de regulación postranscripcional, existen diversos mecanismos, entre los que cabe destacar los mediados por los microRNAs (miRNAs), pequeños RNAs complementarios al RNA mensajero (mRNA) que, o bien median su degradación endo/exonucleolítica, o bien impiden la traducción del mismo a proteína.

El papel de la epigenética en salud y enfermedad aún está emergiendo. La regulación epigenética juega un papel crucial en determinadas funciones y actividades génicas; sin embargo, es altamente sensible y podría incluso ser revertida por influencias ambientales. Los mecanismos epigenéticos en individuos normales son responsables de numerosos procesos fundamentales relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo (secreción hormonal, crecimiento celular, respuesta inflamatoria, maduración de células inmunes, etc). Durante el desarrollo embrionario se produce una represión de la expresión de gran cantidad de genes que progresa a lo largo de las divisiones celulares y es responsable de la especialización. Este proceso se ejecuta mediante un programa de silenciamiento epigenético, es decir, una supresión estable de la expresión genética, generando patrones transmisibles a las células hijas sin que conlleven cambios en la línea germinal [127]. La disregulación de dichos mecanismos se relaciona con el desarrollo de enfermedades como el cáncer, las enfermedades degenerativas o las enfermedades autoinmunes, en las que se produce una acumulación de marcas epigenéticas en las células enfermas, se presupone que por factores ambientales pasados y recientes que alteran los patrones de expresión génica por mecanismos epigenéticos. Así se postula que, vía mecanismos epigenéticos, numerosos factores ambientales externos o internos pueden ejercer su influencia en la patogénesis de

estas enfermedades y explicar en gran medida la contribución ambiental al desarrollo de enfermedades complejas. Estos factores podrían impactar en la regulación de la expresión génica y, finalmente, desencadenar eventos inmunológicos que producirían una alteración del sistema inmune [128].

2. Estructura del ADN

La estructura de la cromatina en los nucleosomas es un importante regulador de la expresión génica. En eucariotas, el ADN es empaquetado como cromatina en el núcleo. La cromatina está estabilizada por las uniones covalentes entre el ADN y las histonas y otras proteínas básicas del núcleo celular. Las modificaciones postraduccionales de las histonas dan lugar a cambios de afinidad en su unión con el ADN, generando una conformación cerrada o abierta de la cromatina (hetero o eucromatina). (Figura 9)



La heterocromatina corresponde a la mayor parte del material nuclear e incluye los telómeros y regiones pericentroméricas, tendiendo estas regiones a ser ricas en secuencias repetitivas y a tener un bajo contenido génico. El resto de genomas está formando eucromatina, es transcripcionalmente activo y contiene la mayoría de los genes.

Figura 9. Estructura de la cromatina

Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, que en los seres humanos consisten en 147pb envueltos alrededor de un octámero de histonas. Se ha descrito una variedad importante de modificaciones de los dominios carboxiterminal y aminoterminal de las histonas, que incluyen la metilación de los residuos de lisina y arginina, acetilación de residuos de lisina, ubiquitinación y sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y

treoninas. Aunque el significado de estas modificaciones no se conoce completamente, la acetilación y metilación de residuos de lisina son marcas moduladoras claves para la activación o represión transcripcional [129,130].

3. Mecanismos epigenéticos de silenciamiento transcripcional.

Los procesos más estudiados en la inhibición de la transcripción génica se producen mediante: a) la metilación del ADN o adición de grupos metilo al ADN; b) la modificación postraslacional por acetilación de histonas, proteínas encargadas de empaquetar el ADN; y c) los RNA no codificantes [131]. Estos procesos son reversibles, catalizados por enzimas y cofactores específicos, lo que indica que las células son capaces de cambiar sus patrones de expresión epigenéticos en respuesta a diferentes estímulos, permitiendo al mismo tiempo su manipulación con intención terapéutica. Sin embargo, muchas de estas marcas epigenéticas tendrán que esperar a la siguiente división mitótica para poder ser modificadas [132,133,134].

Los tres mecanismos epigenéticos están interrelacionados. Así, las expresiones de muchos miRNAs están moduladas por metilaciones del ADN y modificaciones de las histonas [135], y se sabe que los miRNAs son una diana clave en la regulación de proteínas implicadas en los procesos de metilación y modificación de las histonas.

3.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es el proceso epigenético mejor estudiado, y, en mamíferos, se refiere a la inserción de grupos metilo (CH₃) en la base nitrogenada citosina (Figura 10). Es uno de los mecanismos de supresión de la expresión génica y el principal regulador de los genomas *in vivo*. Consiste en el cambio de la base deoxycitosina (dC) en la posición 5' para formar deoximetilcitosina (d^mC) en presencia de un sustrato que dona grupos metilo y una enzima, metiltransferasa del ADN (DNMT), que se encarga de transferir dichos grupos. Las d^mCs se encuentran en los dinucleótidos CG, secuencias que en un 70-

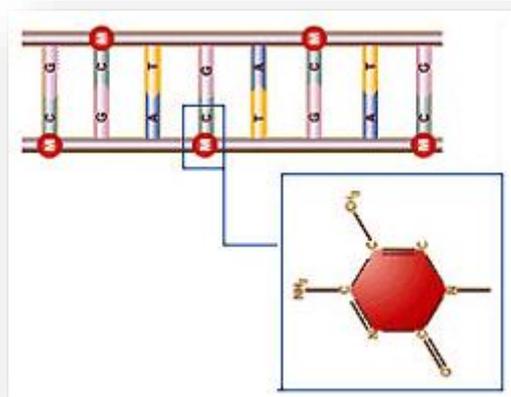


Figura 10. Metilación del ADN

80% se hallan metiladas. La mayoría de las secuencias CGs, llamadas islas CpG (se encuentran en grupos y unidas por grupos fosfato), no están metiladas en su mayoría. Las islas CpG contienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción y actúan como promotores; aproximadamente la mitad de los genes están asociados a islas CpG [136]. En los macrófagos, la metilación de CpG en el promotor del TNF dentro de 200 pb de la región de inicio transcripcional es baja, aproximadamente un 20%, mientras las secuencias CpG hacia arriba (*“upstream CpG motifs”*) tienen niveles de metilación más del 80%. Hallazgos similares se han encontrado en la IL-6 [137,138].

La importancia de la metilación en la homeostasis está sustentada por las diferentes patologías que ocasiona cuando existe algún fallo en dicho proceso. Las funciones de la metilación del DNA incluyen la diferenciación celular, la imprinta genética, la inactivación del cromosoma X, la supresión de DNA en parásitos y la supresión de la transcripción. Ejemplos de enfermedades relacionadas con estos mecanismos son la alfa-talasemia, el síndrome de fragilidad del X, tumores y el lupus eritematoso sistémico (LES) y el LES inducido por medicamentos, entre otros. La metilación del ADN es una marca epigenética estable, que puede ser empleada por la célula como mecanismo de represión de genes a largo plazo, aunque pueden existir mecanismos para revertir la metilación. En general, la hipometilación produce la activación de la transcripción genética, mientras que la hipermetilación produce inactivación de genes. Varios factores tales como agentes ambientales pueden inducir alteraciones en la metilación del ADN, desencadenando así varias enfermedades autoinmunes.

3.2. Modificaciones postraslacionales de las histonas

La acetilación de las histonas es el mecanismo por el cual éstas adquieren grupos acetilo en los aminoácidos de cadenas laterales que están en contacto con el ADN. La acetilación se da específicamente en el aminoácido “lisina” en la región N-terminal de las histonas H3 y H4 en las porciones centrales de los nucleosomas; esta reacción es catalizada por la enzima acetilasa de histonas y el objeto final de la reacción es limitar las interacciones entre H3 y los residuos ácidos de las histonas H2A y H2B, favoreciendo la apertura de la cromatina y por tanto, el aumento en la expresión génica. Por otro lado, la enzima desacetilasa de histonas deacetilan las lisinas, llevando a la condensación de la cromatina. Los procesos de metilación y acetilación trabajan de manera sinérgica, ya que la proteína

MeCP2 se une a CpGs metiladas y reúne a las desacetilasas de las histonas (Figura 11). Las modificaciones postraduccionales de las histonas dan lugar a cambios de afinidad en su unión con el ADN, generando una conformación cerrada (heterocromatina) o abierta (eucromatina) de la cromatina. Al igual que la metilación del ADN, la acetilación no es irreversible, pudiendo modificarse el perfil de acetilación en condiciones favorables, por lo que podría actuar como modulador de la respuesta inmunológica [139].



Figura 11. Modificaciones de las histonas

3.3. Control de la expresión génica por RNAs no codificantes

Según la base de datos NONCODE (versión 4.0) (<http://noncode.org>) hay descritos 92.343 genes en humanos, una proporción alta teniendo en cuenta que el número de genes codificantes que se transcribirán a proteínas es de 19.881 (basado en la base GENCODE, versión 2.1, <http://genecodegenes.org/stats.html>) Sin embargo, se calcula que alrededor de otros 5.000 genes se transcriben en RNAs no codificantes, los cuáles se agrupan en dos clases principales: RNAs de cadena larga o lncRNAs (≥ 200 nucleótidos) y los microRNAs o miRNAs (< 200 nucleótidos). Estos RNA pequeños asociados a complejos multienzimáticos son guiados para el reconocimiento de secuencias complementarias en RNA mensajeros blanco (RNAm). La interacción funcional entre ambos deriva en la degradación del RNAm y en la represión traduccional y, en algunos casos, pueden causar modificaciones epigenéticas. Previamente relacionados con desechos del DNA y ruidos transcripcionales, en los últimos años han sido reconocidos de gran importancia dado que se ha visto que están implicados en procesos

fisiológicos de mantenimiento de las células y homeostasis tisular. Los miRNAs han sido reconocidos como poderosos reguladores de numerosos genes y vías patogénicas en tumores y enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias.

Los lncRNAs recientemente también se están reconociendo su implicación en procesos biológicos, incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis, y, de forma importante, en el desarrollo y respuesta del sistema inmune, aunque los mecanismos aún no son bien conocidos. Hasta la fecha, sólo se han caracterizado un pequeño número de lncRNAs funcionales y hay datos que sustentan su papel en la progresión de enfermedades como el cáncer, la mutagénesis y las enfermedades inflamatorias y autoinmunes [140].

A continuación desarrollamos en un apartado independiente y con mayor extensión las principales características y funciones de los microRNAs dado que son el objetivo de nuestro trabajo.

4. microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNA no codificantes endógenos de pequeño tamaño (aproximadamente 22 nucleótidos), cruciales para la regulación génica en un amplio rango de especies eucariotas, desde plantas hasta mamíferos. Representan una de las clases de moléculas reguladoras de los genes y constituyen otro de los mecanismos de control epigenético. En humanos se han identificado unos 2500 microRNAs (miRNA [141]). Los miRNAs se unen por complementariedad en la zona 3'-UTR del promotor de sus RNA mensajeros diana. Como consecuencia el mRNA es degradado o se impide su traducción; el resultado es una menor síntesis proteica. [142].

Los miRNAs se conservan filogenéticamente y, a menudo, se organizan en tandem o en clustes, lo que puede tener importancia en el control de la expresión génica y en su propia expresión, ya que cuando un grupo de miRNAs de secuencias similares se encuentra agrupado, sus productos se pueden sincronizar para regular un conjunto de mRNAs diana. Sin embargo, estos clusters pueden contener también miRNAs con diferentes secuencias, que se dirigirán cada una hacia sus dianas específicas [143].

Casi el 3% del genoma humano codifica miRNAs los cuales, a su vez, regulan la función de más del 60% del total del genoma humano. Independientemente del número de genes

diana, la interacción entre miRNAs y mRNAs es regulada dentro de una compleja red, de modo que cada miRNA puede tener muchos miRNAs diana y cada mRNA puede estar regulado por múltiples miRNAs simultáneamente.

En mamíferos los miRNAs están implicados en la regulación de múltiples procesos celulares, como el desarrollo embriogénico, la diferenciación celular y la apoptosis [144]. Se sabe que la expresión de los miRNAs es específica para tejidos, fases de desarrollo y varias enfermedades. De ahí el interés creciente por su potencial utilidad en la clínica. Aunque la función de muchos miRNAs no se ha determinado aún, parece que su expresión aberrante puede jugar un papel relevante en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo las enfermedades autoinmunes [145].

A) Biosíntesis de los miRNAs.

En la figura 12 se representa el proceso de biosíntesis de los miRNAs. Los miRNAs maduros son moléculas de unos 20-25 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma, donde realizan su función. La vía canónica de biosíntesis de los miRNAs incluye varias etapas. Inicialmente, los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para generar moléculas precursoras o pri-miRNAs con un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3'. En el núcleo, los pri-miRNAs son procesados por la endonucleasa RNAasa III, llamada Drosha, que genera nucleótidos de 70 pares de bases, llamados pre-miRNAs, los cuales son transportados activamente desde el núcleo al citosol por la enzima Exportina-5. En el citosol, los pre-miRNAs son procesados por otra RNAasa III llamada Dicer para generar un miRNA maduro (miRNA dúplex) imperfecto de dos miRNAs complementarios, formado por una hebra de miRNA maduro y otra de miRNA complementaria. Estas dos hebras de miRNAs se nombran por el mismo número seguido de un sufijo específico ("3p" o "5p" o un asterisco). Posteriormente, el RNA dúplex es separado, de forma que una hebra es degradada (llamada miRNA*), mientras que la otra cadena (miRNA antisentido o guía) es satisfactoriamente incorporada al complejo ribonucleoproteico conocido como RISC o complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC, *del inglés miRNA-induced silencing complex*). El complejo RISC constituye la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción e incluye, entre otras proteínas, a Dicer y proteínas de la familia Argonauta

(Ago), esenciales para mediar la función de silenciamiento del miRNA. El complejo RISC facilita la unión del miRNA a su mRNA diana, bloqueando la síntesis de proteínas por degradación del mRNA o por represión traduccional. Las proteínas Ago están localizadas en regiones específicas del citoplasma denominados cuerpos-P (cuerpos de procesamiento de RNAm o cuerpos GW, que contienen a la proteína GW182), regiones con altas tasas de degradación del mRNA vía deadenilación. También se ha demostrado que el ARNm puede ser almacenado en los cuerpos-P y posteriormente liberado para su traducción [146].

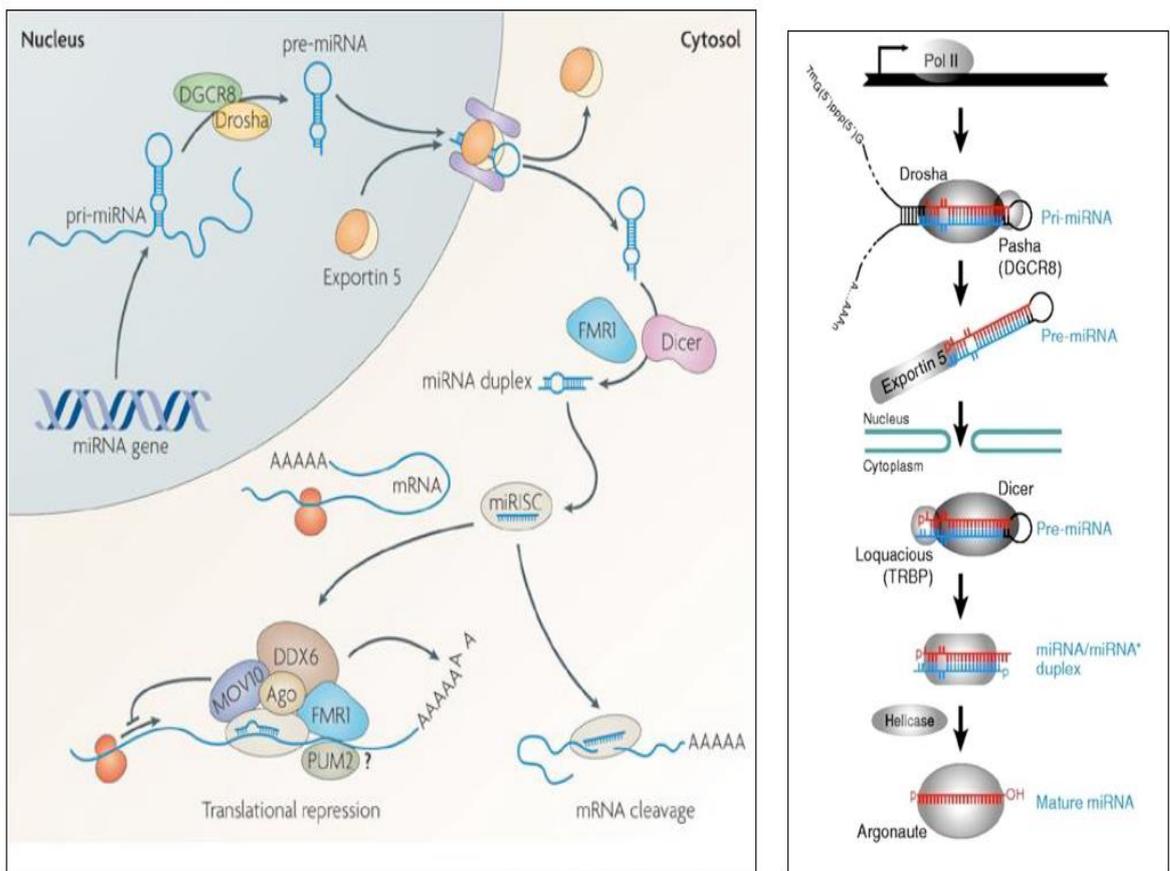


Figura 12. Biogénesis de los miRNAs y mecanismos de regulación de la expresión génica.

B) Mecanismos de acción y funciones de los miRNAs

La funcionalidad de los miRNAs puede ser estudiada utilizando como referente algoritmos bioinformáticos que predicen los RNAs mensajeros dianas de los miRNAs estudiados, tales como TargetScan, miRANDA, etc [147]. En ellos se analiza la probabilidad de interacción teniendo en cuenta diferentes parámetros como complementariedad, la

estructura secundaria formada, de fusión, etc. Permiten predecir dianas potenciales que son silenciadas por los miRNAs.

Como se ha comentado anteriormente, los miRNAs pueden regular negativamente la expresión de los genes a través de tres mecanismos principales: la degradación del mRNA diana por la unión de forma complementaria a ésta, la inhibición de la traducción si la unión en la zona UTR 3' no es totalmente complementaria (represión traduccional), o por interacción con el DNA que provoca el silenciamiento de la cromatina (Figura 13).

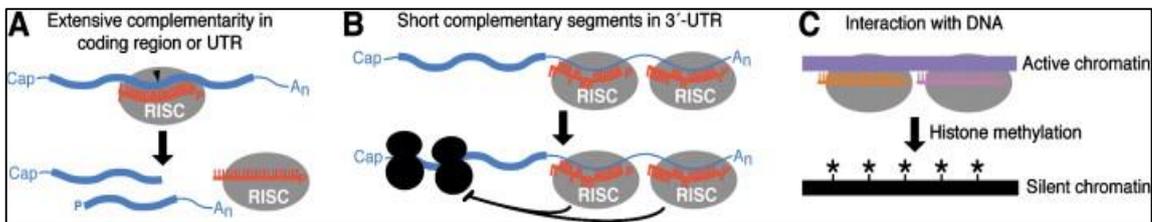


Figura 13. Mecanismos de actuación de los miRNAs. Tomado de Bartel DP. *Cell*.2014; 116(2):215-233 [148]

La utilización de un mecanismo u otro depende del mRNA diana. Una vez el miRNA se incorpore en el complejo citoplasmático RISC, actuará un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad no es total o es insuficiente se producirá una inhibición de la traducción. Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar hacia el reconocimiento y la destrucción de miRNAs adicionales. Otro posible mecanismo es el silenciamiento de la cromatina a través de la unión del miRNA con el ADN, realizando represión transcripcional o postranscripcional [148].

Los miRNAs están implicados tanto en el desarrollo como en numerosas funciones fisiológicas y procesos de enfermedad. Así, el desarrollo embrionario está estrechamente regulado por la expresión temporal de miRNAs específicos. La morfogénesis de la piel, el desarrollo del páncreas, la diferenciación del músculo, el crecimiento cardíaco y el desarrollo neural son procesos en los que los miRNAs están implicados. Asimismo, un gran número de tumores y otras enfermedades no malignas como el Alzheimer, enfermedades neuropsiquiátricas, infecciones virales como la hepatitis y el SIDA, la cirrosis biliar primaria y

enfermedades reumáticas como el LES y la AR se asocian con alteraciones en la expresión de los miRNAs [149,150].

Como reguladores fundamentales de la expresión de los genes, los miRNAs son pivotaes en la modulación del desarrollo del sistema autoinmne, la función inmune normal y la autoinmunidad. Se han identificado numerosos miRNAs diferencialmente expresados en las células hematopoyéticas, estando regulada su expresión durante la hematopoyesis y la diferenciación celular. El mecanismo de autoinmunidad se caracteriza por un aumento de las células inmunes y un fallo o ineficacia de la regulación inmune, donde los linfocitos Th17 actúan promoviendo la autoinmunidad y los linfocitos T reguladores (LTreg) ejerciendo un efecto protector. Lo que parece que conduce a una respuesta patológica es el disbalance funcional entre ambos subtipos celulares. El papel fundamental de los miRNAs en la regulación de estas células se ha demostrado en varios estudios. Así por ejemplo, se ha identificado expresión de miR-326 en los linfocitos asociado con la polarización hacia la línea celular Th17; su expresión correlaciona con actividad y severidad en esclerosis múltiple y encefomielitis autoinmne. Por el contrario, ratones incapaces de generar miRNAs en sus linfocitos Treg desarrollaron enfermedad autoinmune severa similar a los ratones deficientes en linfocitos Treg, debido a su incapacidad para suprimir linfocitos T activados bajo condiciones inflamatorias. También se ha visto que el miR-155 es un regulador importante para el mantenimiento de la actividad supresora celular y que inhibe vías inflamatorias inducidas por lipopolisacáridos en monocitos humanos derivados de células dendríticas y, junto con el miR-181b suprime la capacidad de los linfocitos B para generar inmunoglobulinas. Asimismo, también se sabe que los miRNAs intervienen en la diferenciación de los linfocitos B hacia sus células efectoras, como los lifocitos B memoria y las células plasmáticas [146].

C) Regulación de los miRNAs

La expresión aberrante de los miRNAs puede producirse por numerosos mecanismos, tales como anomalías cromosómicas, inserción de material genético extraño como genomas virales, mutaciones o polimorfismos de SNPs, así como por otros cambios epigenéticos y defectos en las vías de la biogénesis de los miRNAs. Otra característica de los miRNAs es que pueden presentar mutaciones y polimorfismos, no sólo en secuencias de RNAs maduros, sino también en las secuencias de los pri y pre-miRNAs, lo que puede afectar a la biogénesis de los miRNAs o a la acción del miRNA maduro sobre su diana [151].

Esto tiene una importante implicación para el uso de miRNAs como biomarcadores, de modo que la identificación de polimorfismos o mutaciones de los miRNAs asociados a determinadas patologías puede ser útil para su establecimiento como predictores del desarrollo de enfermedades. El conocimiento de la epigenética ha abierto un horizonte prometedor para el control y/o prevención de muchas enfermedades, entre ellas las enfermedades autoinmunes, así como de posibles nuevos biomarcadores de susceptibilidad y pronóstico, e incluso incidir sobre vías epigenéticas con fines terapéuticos.

5. Relación de la epigenética con las enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades complejas, cuya etiología es multifactorial. Ya se ha comentado previamente el hecho de que en las enfermedades autoinmunes las modificaciones epigenéticas podrían explicar el enlace entre los factores genéticos y ambientales como responsables del inicio y el desarrollo de la enfermedad.

Se conoce la implicación de la susceptibilidad genética en las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, el componente genético no es el único actor en su desarrollo. En el caso de la AR, se desconocen en gran medida los factores ambientales que puedan participar en su aparición, lo que incrementa la dificultad para predecir su desarrollo. Muchos de los factores ambientales pueden modificar el perfil epigenético de los individuos expuestos a ellos. De forma general, podemos decir que, independientemente de la carga genética, la actividad transcripcional de los genes está exquisitamente regulada de forma específica en cada tejido, en función del estado evolutivo. Durante el desarrollo embrionario tiene lugar una represión en la expresión de gran cantidad de genes que, a lo largo de las divisiones celulares, es responsable de la especialización [152]. Como hemos visto, esto se ejecuta mediante un programa de silenciamiento epigenético, es decir, se produce una supresión estable de la expresión de genes, generando patrones transmisibles a las células hijas, pero sin que conlleve cambios en la línea germinal [153].

Se postula que, en enfermedades como el cáncer, las enfermedades degenerativas y la inflamación, se produce una acumulación de marcas epigenéticas en las células enfermas, por lo que se cree que distintos factores ambientales conducen a la alteración de los patrones de expresión génica por mecanismos epigenéticos, pudiendo estos, en consecuencia, explicar en gran parte la contribución de los factores ambientales al desarrollo de estas enfermedades [154]. Es decir, el riesgo ambiental puede actuar modificando el epigenoma, por lo que la

regulación epigenética de la expresión de los genes está implicada en el desarrollo de la enfermedad. Así, por ejemplo, y como se ha mencionado anteriormente, se ha visto que la concordancia de AR incidente en gemelos monocigotos es infrecuentemente del 100%, siendo en la mayoría de los casos en torno al 12-35%, lo que confirma la importancia de los factores ambientales en la determinación del riesgo de enfermedad. Es más, numerosos factores de riesgo relevantes en el desarrollo de la AR se correlacionan con mecanismos epigenéticos, como los niveles de metilación del DNA y modificaciones de las histonas, incluyendo el envejecimiento, el género, la exposición al humo del tabaco y los niveles plasmáticos de vitamina D [155].

6. Estudios epigenéticos en AR

El número de estudios que aportan datos sobre modificaciones epigenéticas en AR son limitados. Sin embargo, existen algunas observaciones procedentes de diversos estudios sobre patrones de metilación del ADN. Por ejemplo, el análisis de la metilación del ADN en linfocitos T ha revelado una hipometilación global en células de pacientes con AR comparado con los controles sanos [156]. También se ha observado hipometilación del ADN en los FSAR, mediador fundamental de la destrucción tisular en la AR [157]. En 2013, Nakano et al [158] llevaron a cabo un estudio genómico en fibroblastos sinoviales de pacientes con AR y osteoartritis, y encontraron que 1859 locus, relevantes para el movimiento celular, adhesión y circulación estaban diferencialmente metilados en pacientes con AR (732 hipometilados y 1127 hipermetilados). En otro estudio Nile et al [138] investigaron patrones de metilación del ADN en la región promotora de la IL-6 en monocitos de sangre periférica de pacientes con AR e identificaron patrones de hipometilación.

Por otra parte, como moduladores de la expresión génica, los miRNAs juegan un papel esencial en los mecanismos fisiopatológicos de los pacientes con AR. Desde 2008, se han documentado en la literatura un importante número de estudios sobre la expresión de los miRNAs en líquido sinovial, tejido sinovial, células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral blood mononuclear cell*) y/o FSAR de pacientes con AR, y la posible utilidad de su detección directa en sangre y sero para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento en estos pacientes. Mediante la regulación de la expresión de numerosos genes, los miRNAs están implicados en la patogénesis de la AR, tienen un papel crucial en el mantenimiento de la respuesta inmune e inflamatoria y se sabe que están involucrados en el desarrollo de la hiperplasia sinovial y destrucción articular y que incluso podrían favorecer la

perpetuación de la actividad de la enfermedad en la milla inflamatoria de la articulación reumatoide [155].

En la figura 14 se muestra de forma esquemática la posible participación de algunos miRNAs en distintas etapas de la respuesta inflamatoria y autoinmune [159].

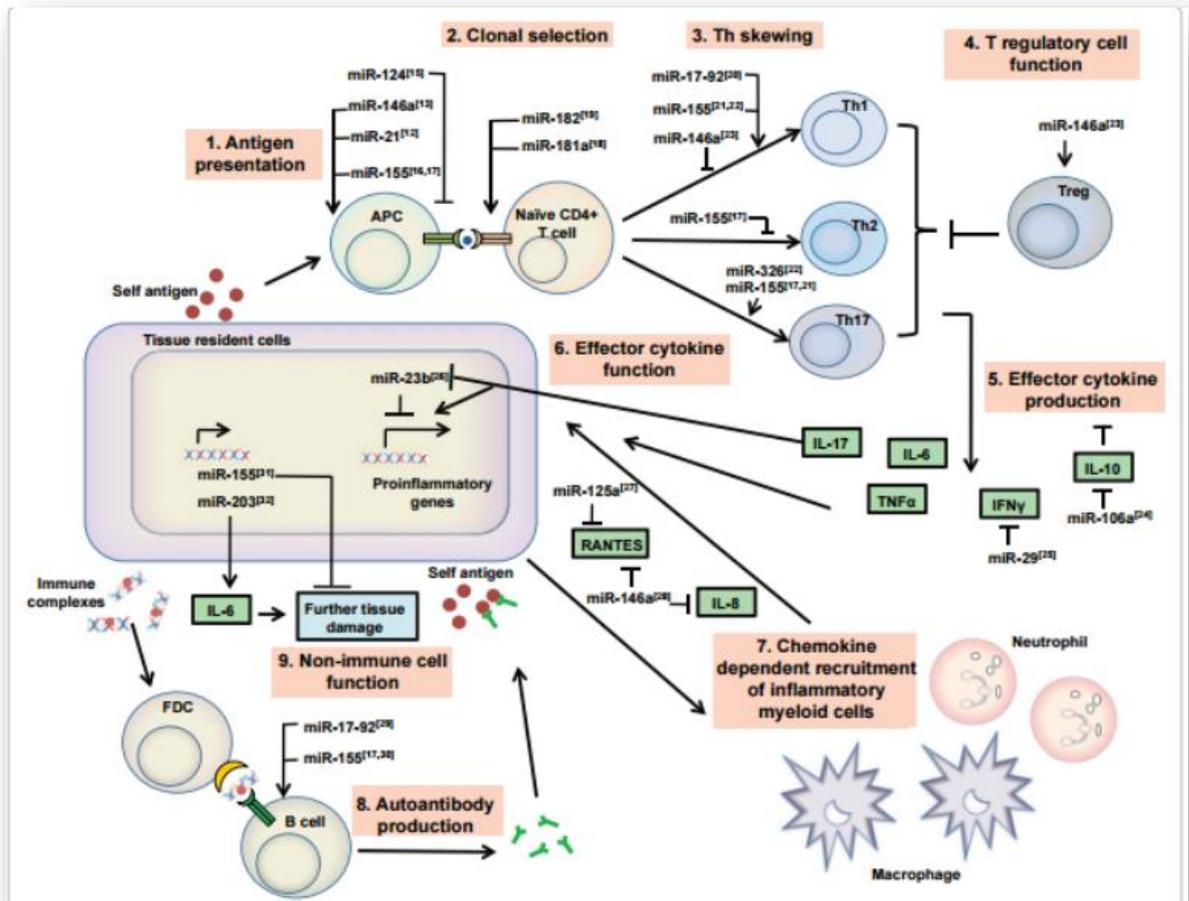


Figura 14. miRNAs y vía inflamatoria.

Así, los miRNAs juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria, la proliferación celular de los sinoviocitos y la producción de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) en la AR. Esto hace que se hayan estudiado como posible biomarcadores para la detección y el diagnóstico precoz de la enfermedad así como posibles factores de mal pronóstico. Por ejemplo, una serie de miRNAs se han encontrado que están disregulados en subtipos celulares dentro de la articulación de pacientes con AR, y, más recientemente, varios estudios sugieren que regulan la activación de los leucocitos y la producción de

citoquinas que contribuyen al componente inmunológico de la patología sinovial efectora. Como se ha comentado previamente, se sabe que las citoquinas inflamatorias (TNF α , IL-1 β y IL-6) y, entre ellas, la IL-17, como factor principal en la activación del receptor activador del factor estimulador de la cadena ligera kappa de los linfocitos B activados (NF-kB), están involucradas en el desarrollo de enfermedades inflamatorias autoinmunes. Se ha encontrado que 6 miRNAs, let-7a, miR-26, miR-146a/b, miR-150 y miR-155 están significativamente aumentados en los linfocitos T productores de IL-17 [160]. Además, miR-146a, miR-155, miR-132 y miR-16 sobreexpresados en las PBMCs en pacientes con AR comparado con controles, correlacionando con actividad de la enfermedad [161]. También se han descrito miRNAs que se encuentran sobreexpresados en los FSAR, tales como miR-155 y miR-146a. Su sobreexpresión parece que juega un papel importante en la patogénesis de la AR.

Entre ellos, miR-146a ha sido bien establecido como regulador de la respuesta inmune e inflamatoria, y se ha demostrado que está fuertemente expresado en el tejido sinovial, sinoviocitos, PBMCs y otras células que expresan IL-17 de pacientes con AR [162, 163]. Varios trabajos han revelado que miR-146a (que tiene como gen diana FAS1, implicado en la modulación de la apoptosis de los linfocitos T) se encuentra asociado con la inflamación y que regula la proliferación de las células inmunoreguladas, ejerciendo un papel positivo en la respuesta inmune e inflamatoria en pacientes con AR. Los niveles aumentados de miR-146a en los linfocitos T CD4 de pacientes con AR correlacionan positivamente con los niveles de TNF- α y modulan la supresión de la apoptosis de las células T. Su posible utilidad para el diagnóstico ha sido evidenciada en diversos trabajos, como el realizado por Nakasa y cols. en el cual, mediante técnicas de RT-PCR, identificaron una sobreexpresión de miR-146, junto con un aumento del TNF- α , en el tejido sinovial de pacientes con AR, comparado con pacientes con osteoartritis y tejido sinovial normal [164]. Otro estudio demostró que la expresión de miR-146a estaba significativamente aumentada en linfocitos T CD4+ de pacientes con AR, y su nivel correlacionaba positivamente con los niveles de TNF α y que la adición de éste aumentaba la expresión de miR-146a en los linfocitos T [165]. Además de este papel en la patogenia de la AR, también se ha demostrado que un aumento de miR-146a se correlaciona positivamente con la VSG, el DAS28 y los niveles de TNF- α en suero, lo que sugiere su posible valor como biomarcador de pronóstico [166].

Otros miRNAs como miR-19a/b, miR-21 y miR-323-3p se encuentran implicados en el mantenimiento del balance entre activación inmune y tolerancia [167, 168]. Además de estos,

miR-155 tiene un potencial efecto regulador en una amplia variedad de células inmnes, y se ha visto que su represión en linfocitos de la sinovial reumatoide reduce la expresión del TNF α y su sobreexpresión parece que podría modular las propiedades destructivas de los fibroblastos sinoviales, inhibiendo a las metaloproteasas de la matriz (MMP-3) [169].

En relación a la hiperplasia sinovial, la manifestación fenotípica de la AR, parece estar relacionada con una resistencia a la apoptosis de células residentes de la sinovial y FSAR, que contribuye a la proliferación celular tumoral-like, proceso vital en la respuesta inflamatoria y la destrucción articular mediante la producción de citoquinas, quimioquinas y factores angiogénicos. El mecanismo fundamental por el que actúan es mediante la inhibición de la apoptosis. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión basal de miR-34a* está reducida en FSAR de pacientes con AR comparado con pacientes con artrosis, lo que resulta en un aumento de su diana directa que es la proteína inhibidora de la apoptosis ligada a X [170]. Por el contrario, miR-15a se ha visto que induce apoptosis a través de la regulación negativa de la expresión de la proteína BCL-2 (proteína 2 del linfoma de células B, del inglés B-cell CLL/Lymphoma 2) [171]. Existen otros reguladores negativos de la hiperplasia sinovial son miR-124a, miR-34a* y miR-155, que inhiben la proliferación celular y detienen el ciclo celular en la fase G1 [172].

La destrucción articular está relacionada con la hiperplasia sinovial y se produce por estimulación de la diferenciación de los osteoclastos. Las MMPs se consideran marcadores de progresión del daño articular [173]. Varios miRNAs se han relacionado con la osteoclastogénesis y la liberación de MMPs. Por ejemplo, el aumento de miR-146a parece que inhibe la destrucción a través de la supresión de la osteoclastogénesis, y que su administración la previene en modelos experimentales de artritis en ratas [174]. Así, como se ha visto anteriormente, la sobreexpresión de miR-146a favorece la inflamación por un lado, pero inhibe la erosión ósea mediada por el osteoclasto, por otro. Lo mismo ocurre con el miRNA-223, ya que suprime la osteoclastogénesis in vitro, mientras que está intensamente expresado en el sinovio inflamado [175,176]. miR-155 también parece que podría tener un papel protector en la destrucción articular, ya que se ha visto que su sobreexpresión en FSAR suprime la inducción de MMPs [177]. Por tanto, los miRNAs tienen una funcionalidad compleja, con efectos en principio contrarios dentro de un mismo evento patogénico. Estas acciones opuestas observadas en las funciones de los miRNAs dentro del proceso inflamatorio en AR les confiere una utilidad como marcador de diagnóstico y pronóstico, pero

sugiere que la intervención sobre ellos con fines terapéuticos, en algunos casos, podría tener efectos contradictorios, por ejemplo, suprimiría la respuesta inflamatoria pero agravaría la destrucción articular, aunque se necesitan más estudios para poder realizar afirmaciones más consistentes en este sentido. Otros miRNA, sin embargo, no han mostrado hasta la fecha estos efectos paradójidos, como miR-19a/b y miR-203 parece que pueden ser protectores tanto de actividad como de destrucción, mediando un descenso de IL-6 y MMP3 [178].

Por tanto, el papel de los miRNAs en la regulación del mecanismo inflamatorio de la AR parece claro, pero hasta la fecha sólo algunos de ellos han demostrado correlacionar con marcadores de actividad (i.e. los niveles de miR-223 circulante correlacionan positivamente con el título de factor reumatoide, e inversamente con citoquinas inflamatorias; los valores de miR-451 correlacionan con actividad de la enfermedad, así como con la VSG y los niveles de IL-6), incluso con el diagnóstico precoz de enfermedad (se han encontrado niveles reducidos de miR-146a, miR-155 y miR-16 en pacientes con AR precoz comparado con formas establecidas) [179,180].

En conclusión, diversos estudios han demostrado que alteraciones en los genes regulados por los miRNAs, en la biogénesis de los mismos, o en su unión a la molécula diana, pueden predisponer a una respuesta autoinmune o un daño tisular, o ambos. Además, varios factores ambientales se asocian con patrones de expresión específicos de los miRNAs que pueden contribuir a la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Es más, diferencias en el perfil de miRNAs en los pacientes puede reflejar diferencias en las vías de señalización y, por tanto, explicar porque unos pacientes responden al bloqueo de determinadas IL, como los agentes antiTNF- α , y otros no. El hecho de que los miRNAs pueden ser detectados en un amplio rango de muestras accesibles y de que su expresión puede ser analizada de forma global o de forma selectiva, unida a su relativa estabilidad, los convierte en prometedores candidatos como biomarcadores para diagnóstico, pronóstico y actividad en enfermedades autoinmunes. Además, el estudio del impacto de los cambios detectados en la expresión de miRNAs entre controles y diversos estados de enfermedad puede mejorar nuestro conocimiento en la patogénesis de dichos procesos (Figura 15).

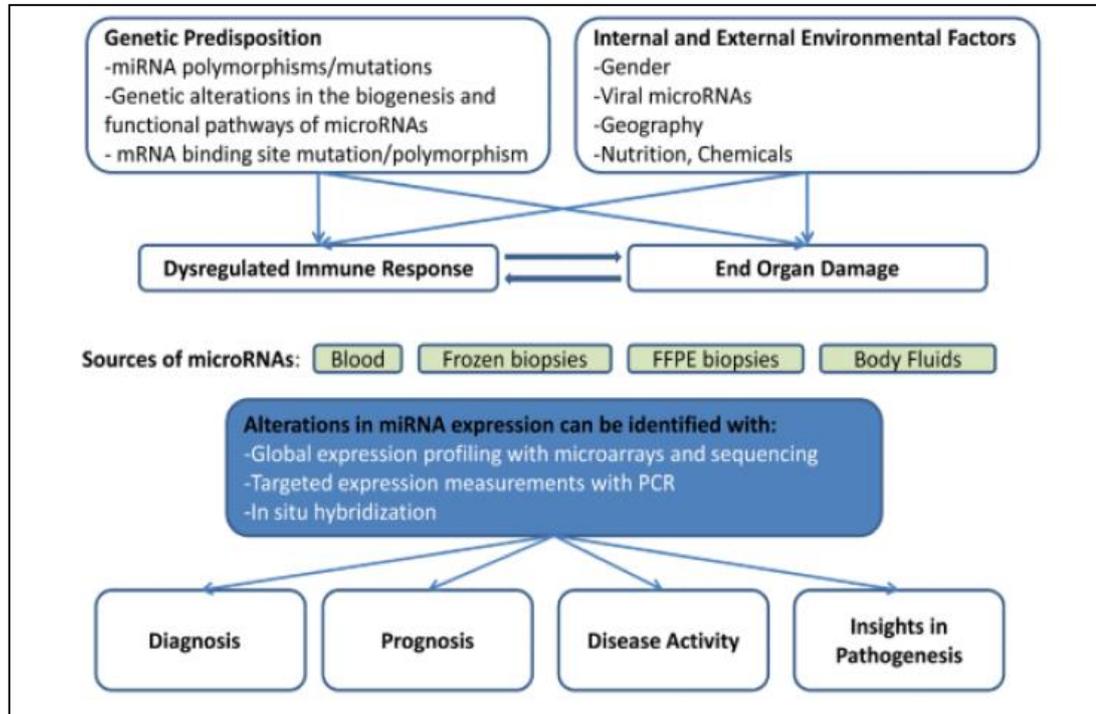


Figura 15. Potencial papel de los miRNAs como biomarcadores en las enfermedades reumáticas. Tomado de Alevizos I, Illei G. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 [146].

Hipótesis

2. HIPÓTESIS

La introducción de la terapia anti-TNF- α ha mejorado significativamente el pronóstico de los pacientes con AR. Se sabe que el TNF α juega un papel central en la patogénesis de la AR y es fundamental en el desarrollo del daño estructural, la marca de la enfermedad. Sin embargo, una proporción de pacientes no responden a estas terapias [181]. La respuesta al tratamiento probablemente es multifactorial; sin embargo, se ha visto que variaciones en los genes o su expresión puede identificar a pacientes que pudieran tener mayor probabilidad de responder al tratamiento [182]. Se han descrito potenciales genes predictores de respuesta a la terapia anti-TNF- α , mediante la identificación de variantes dentro de genes candidatos [183], sin embargo, muy pocos de estos marcadores han demostrado ser reproducibles de forma consistente en los distintos estudios. Otros biomarcadores séricos potenciales de respuesta han sido explorados, incluyendo citoquinas y autoanticuerpos, incluso el desarrollo de anticuerpos contra el propio fármaco antiTNFalfa se ha correlacionado con fallo al tratamiento [184,185].

Más recientemente, están emergiendo estudios sobre el papel de anomalías epigenéticas como claves en la patogénesis de la AR. El efecto de la epigenética en la enfermedad varía desde su contribución en el complejo mecanismo de la enfermedad hasta la identificación de biomarcadores para el tratamiento precoz y la determinación de la respuesta a la terapia. Se han descrito anomalías en la expresión de los miRNA relacionados con citoquinas inflamatorias, células Th17 y T reguladoras así como en células B en varias enfermedades autoinmunes [186] y existen estudios que han demostrado una expresión alterada de miRNA en plasma y líquido sinovial de pacientes con AR [187]. En la última década, los miRNAs están emergiendo como potenciales marcadores serológicos para deccción de enfermedades como el cáncer. Se ha demostrado que pueden ser expresados de forma aberrante en diferentes estadios de la progresión de la AR, por lo que pueden ayudar en la monitorización de la severidad de la enfermedad [186]. Además, poseen una serie de características (su estabilidad en suero y la especificidad de tejido) que los hacen ideales para su uso como biomarcadores. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos datos que evalúen los cambios ocurridos en el perfil en suero de miRNAs en pacientes con AR tras el tratamiento con terapias biológicas. Para ello diseñamos este trabajo con el objetivo de

investigar si el cambio en los niveles séricos de miRNA podría ser útil como posibles biomarcadores predictivos del efecto terapéutico de los fármacos antiTNF- α en AR.

La hipótesis de partida de nuestro trabajo es que el cambio en la expresión de los niveles circulantes de miRNAs en el suero de pacientes con AR tras 6 meses de tratamiento con terapia combinada antiTNF- α /DMARDs puede ser útil como biomarcador para predecir y monitorizar la respuesta al tratamiento.

Objetivos

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es:

Investigar los cambios producidos en los niveles de miRNAs circulantes en pacientes con AR en respuesta a la terapia combinadas anti-TNF α /DMARDs, con el fin de identificar posibles biomarcadores predictivos de los efectos terapéuticos de estos fármacos.

Objetivos secundarios:

1. Analizar el perfil de miRNAs diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento combinado anti-TNF- α /DMARDs en pacientes con AR y su relación con procesos celulares implicados en fenómenos inflamatorios y autoinmunes.
2. Estudiar si el perfil de cambio de expresión de los miRNA se correlaciona con una mejoría en la actividad de la enfermedad.
3. Determinar el posible valor de los miRNAs como biomarcadores de respuesta y monitorización del tratamiento con antiTNFalfa en pacientes con AR.

Pacientes y Métodos

3. PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

La población a estudio del trabajo fueron pacientes diagnosticados de AR, según criterios ACR 2010 [188] en tratamiento con fármacos antagonistas del TNF (etanercept, adalimumab o infliximab), procedentes del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España). Se incluyeron 95 pacientes con AR (12 varones y 83 mujeres) durante un periodo de seguimiento de 6 meses, una vez obtenida la aprobación del comité ético del Hospital Reina Sofía de Córdoba (España). Los pacientes manifestaron su consentimiento informado por escrito.

Se incluyeron pacientes con AR que habían sido refractarios al tratamiento con al menos 2 DMARDs, uno de los cuales era Metotrexato. Sólo se incluyeron en el estudio a aquellos pacientes que nunca habían recibido fármacos anti-TNF. Entre los 95 pacientes incluidos en el estudio, 55 recibieron infliximab (IFX; 3mg/kg en infusión intravenosa, administrado al inicio, tras 2 y 6 semanas, y posteriormente cada 8 semanas), 25 recibieron etanercept (ETA; 25 mg en infusión subcutánea dos veces a la semana) y a 15 se les administró adalimumab (ADA; 40 mg en infusión subcutánea una vez a la semana). De forma adicional, se permitió que los pacientes recibieran tratamiento concomitante con otros DMARDs, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticoides (Tabla 1).

Los parámetros clínicos y de laboratorio incluidos en el protocolo de tratamiento consistieron en una evaluación clínica y analítica basal (T1) y a los 6 meses de tratamiento (T2). La evaluación clínica incluyó contaje de articulaciones dolorosas (TJC) e inflamadas (SJC), valoración global y del dolor mediante escala analógica visual (EVA; rango de 0 a 100 mm) del paciente y valoración global por el médico (VGP, VGM), evaluación de la actividad mediante el DAS28 (tasa de actividad de la enfermedad, *disease activity score* sobre 28 articulaciones), el SDAI (Índice de actividad de enfermedad simplificado, *simplified disease activity index*), calidad de vida, utilizando el cuestionario HAQ (cuestionario de evaluación de salud, *Health Quality Questionnaire*,) y el número previo de DMARDs asociados con el

tratamiento antiTNF- α . La evaluación serológica incluyó valores de Factor Reumatoide (FR), anticuerpos anti-peptidos cíclicos citrulinados (anti-CCPs), proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el estudio.

	Cohorte Exploratoria (n = 10)	Cohorte de Validación (n = 85)
Sexo (Hombre/Mujer)	1/9	11/74
Edad, media (rango)	54.6 (38–74)	53.6 (24–72)
Tiempo de evolución (a), media (rango)	10.1 (2–23)	10.4 (1–36)
Fumador, numero (%)	4(40%)	23 (27.1%)
TJC, media	13.7 \pm 5.8	15.7 \pm 4.6
SJC, media	16.9 \pm 6.5	11.5 \pm 3.7
DAS28, media	5.9 \pm 0.7	5.7 \pm 0.6
SDAI	39.7 \pm 14.9	36.3 \pm 10.9
HAQ	2.14 \pm 0.5	2.1 \pm 0.3
VSG (mm), media	55 \pm 18.62	55.9 \pm 16.6
PCR (mg/dL), media	3.6 \pm 1.12	3.8 \pm 2.1
Factor Reumatoide positivo, n(%)	7(70%)	60(70.6%)
Anticuerpos anti-CCP positivo, n(%)	4(40%)	59(69.4%)
Terapia antiTNFα, n(%)		
Infliximab	9(90%)	46(54.1%)
Etanercept	1(10%)	24(28.2%)
Adalimumab	0	15(17.6%)
Tratamiento con Corticoides, n de pacientes(%)	4(40%)	55 (64.7%)
Numero de DMARD previos (Media\pmSD)	2.7 \pm 0.8	2.8 \pm 1.1

Hidroxicloroquina, n(%)	3(30%)	22 (25.9%)
Azatioprina, n(%)	0 (0%)	5 (5.9%)
Metotrexato, n(%)	7 (70%)	58 (68.2%)
Sulfasalazina, n(%)	1 (10%)	7 (8.2%)
Ciclosporina, n(%)	1 (10%)	2 (2.4%)
Leflunomida, n(%)	2 (20%)	33 (38.8%)

TJC = Tender Joint Count, SJC = Swolen Joint Count, DAS28 = Disease Activity Score, SDAI = Simplified Disease Activity Index, HAQ = Health Assessment Questionnaire, VSG = velocidad sedimentacion globular, PCR = protein C reactiva.

Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes de forma previa a la administración de la primera dosis y tras 6 meses de tratamiento. Para evitar cambios en la composición de la sangre promovidas por la dieta y el ciclo circadiano, las muestras fueron recogidas a primera hora de la mañana, después de un periodo de 8 horas de ayuno, antes de la administración de la dosis de tratamiento correspondiente a los 6 meses.

La respuesta al tratamiento combinado antiTNF- α /DMARDs se evaluó mediante los criterios EULAR, basados en el índice de actividad DAS28 [55]. Los pacientes fueron divididos en respondedores y no respondedores, basado en las modificaciones ocurridas en el score DAS28. El índice DAS28 incluye el recuento de articulaciones dolorosas e inflamadas, la valoración global y del dolor por el paciente y la valoración global por el médico mediante escala analógica visual y parámetros de laboratorios (VSG ó PCR). Siguiendo los criterios EULAR de respuesta basados en el DAS28 basal y su cambio, consideramos como pacientes respondedores a la terapia a los que mostraron o bien una buena respuesta (considerada como un cambio en el DAS28 ≥ 1.2 y un valor de DAS28 ≤ 3.2 a los 6 meses de tratamiento) o bien una respuesta moderada (si presentaban un valor de DAS28 a los 6 meses entre 3.2 y 5.1 y una reducción de entre 0.6 y 1.2). Los pacientes que presentaron un valor DAS28 a los 6 meses > 5.1 o una reducción respecto al DAS28 basal < 0.6 se consideraron no respondedores.

2. Recogida de las muestras de sangre y evaluación de los parámetros biológicos

Se recogieron muestras de sangre periférica de los sujetos incluidos en el estudio mediante punción venosa directa, bien en tubos conteniendo anticoagulante ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) o en tubos específicos para muestras de suero. Todas las muestras de sangre fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a la recogida. La muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente el plasma y el suero fueron transferidos a un tubo libre de RNasa y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

La determinación de FR fue llevado a cabo por el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Reina Sofía, utilizando un ensayo inmunturbidimétrico (Qantia RF kit, ABBOT Laboratories, Abbott Park, Chicago, IL, USA). Se consideraron positivas concentraciones >30 UI/ml. Las determinaciones de los anticuerpos antiCCP, también llevadas a cabo por dicho Servicio hospitalario, se testaron con el kit EDIA™ anti-CCP (Euro Diagnostica, Malmö SWEDEN), siendo considerado positivos títulos a una concentración >5 U/ml.

Los niveles plasmáticos de diversos mediadores inflamatorios, incluidos interleuquinas (IL-6, IL-4, IL-17, IL-22, IL-23), la proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1, del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), el TNF- α , el receptor soluble del TNF tipo II (sTNFRII) y el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) fueron cuantificados usando una técnica ELISA basada en citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante usando el kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, CA, USA). Los resultados se calcularon mediante el software FlowCytometry Pro Version 2.2.1 (eBioscience). Se detalla a continuación dicho protocolo de análisis.

2.1. Protocolo de análisis mediante Flow Cytomix

La citometría de flujo es una técnica de análisis que mide las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen células o partículas conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Para su análisis por citometría de flujo, las células o partículas deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Al atravesar el rayo de luz, las partículas interactúan con éste, causando dispersión de la luz. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan y, al medir la reflexión de la luz de manera lateral, se evalúa la granularidad o complejidad de éstas. Las microesferas unidas a anticuerpos monoclonales marcados con fluoróforos diferencian a los antígenos complementarios que se unen a ellas.

En este estudio, se utilizó el ELISA multiplex FlowCytomix™ (Comboplex™ Bender MedSystems, Viena, Austria) con un citómetro de flujo como el FC500 Beckman Coulter (Miami, FL, EEUU) según las especificaciones del fabricante.

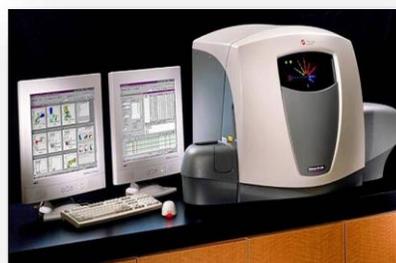


Figura 1. Citómetro de Flujo FC500 Beckman Coulter

Protocolo:

- 1) Estándares: se preparan los estándares realizando diluciones seriadas (por ejemplo, 1/4) de un estándar suministrado con el kit, resultando 7 estándares que se analizan por duplicado. Como control negativo (blanco) se utiliza diluyente del estándar.
- 2) Muestras: para la preparación de las muestras se pueden realizar diluciones en función de la molécula a analizar, o utilizarlas sin dilución.

- 3) Se procede a humectar la placa con la adición de tampón y eliminación de dicho tampón mediante filtración por vacío. En la placa ya preparada, se adiciona, en primer lugar, la mezcla de microesferas que llevan incorporado el anticuerpo dirigido frente a las diferentes citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento y en segundo lugar, el anticuerpo de detección (marcado con biotina).
- 4) Se añaden posteriormente los estándares, controles y muestras en el pocillo correspondiente y se incuba la placa a temperatura ambiente en agitación durante 2 horas.
- 5) Después de la incubación de las muestras, se realizan 3 lavados a cada pocillo y se adiciona la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) a cada pocillo y se incuba la placa a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora. El SAPE se une al anticuerpo de detección biotinilado en la superficie de la microesfera. Por último, se realizan una serie de lavados antes de la adquisición y análisis en el Citómetro de Flujo.

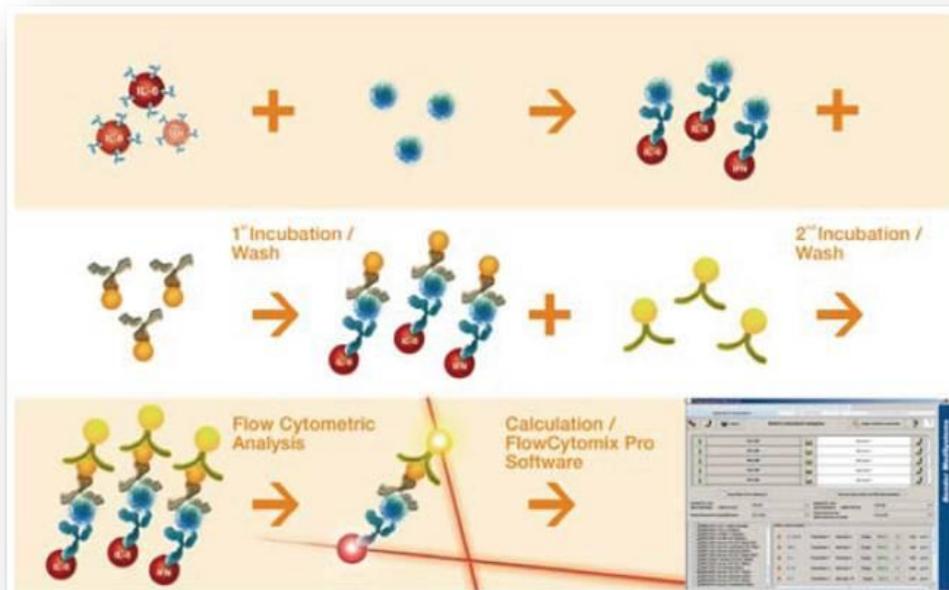


Figura 2. Esquema de interacciones moleculares del ELISA multiplex FlowCytomix™

En el ensayo realizado, las microesferas se diferencian por sus tamaños e intensidad de fluorescencia captada por citometría de flujo (Figura 2). El ensayo FlowCytomix utiliza dos microesferas de distintos tamaños (4 micras y 5 micras). Cada uno de los dos tamaños de las poblaciones de microesfera se diferencia por las diversas intensidades de un colorante fluorescente. El medio de contraste puede ser excitado con un Argón, He-Ne, o incluso láser UV, y emite en el extremo rojo (690 nm) que se detecte en el canal FL-3/FL-4. La combinación de las dos bolas de diferentes tamaños y diferentes intensidades de fluorescencia hace posible distinguir hasta 20 juegos de microesferas fluorescentes diferentes. La Estreptavidina-PE, que se une al conjugado de biotina, emite a 578 nm y se detecta en el canal FL-2 y permite la cuantificación del analito.

Los valores del último estándar son considerados como límites de detección para cada mediador, tal y como recomienda el fabricante. Aquellos valores por debajo del nivel de detección se equiparan al nivel de detección.

Se adquieren un mínimo de 300 eventos (*beads*) para cada muestra, obteniéndose valores de intensidad media de fluorescencia. Las concentraciones de proteína analito se calculan automáticamente sobre la base de datos de la curva estándar utilizando FlowCytomix Pro 2.3 Software™ (Bender MedSystem, Viena, Austria).

2.2. Aislamiento del microRNA del suero

El ARN total, incluyendo la fracción de miRNA, fue extraído del suero de los pacientes usando el kit *QIAzol miRNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA) con algunas modificaciones. Para todas las determinaciones se emplearon 200 μ l de suero previamente descongelado en hielo, junto con 1 mL del reactivo para lisis QIAzol. Estas muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para inactivar las RNAasas.

Para normalizar posibles variaciones entre muestras durante la extracción del ARN, se añadieron a cada muestra 5 fmol de un miRNA sintético que no presenta homología con ninguna secuencia en el ser humano, y se utilizó como control interno (**C. elegans miR-39**

miRNA mimic: 5´-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3´). El resto del protocolo de extracción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, tal y como se detalla a continuación.

Protocolo

1) Las muestras de suero o plasma (200 μ l) se lisan en QIAzol reactivo de lisis (1ml), una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina, diseñado para facilitar la lisis de los tejidos, inhibir RNAsas y eliminar la mayoría del ADN celular y las proteínas del lisado por extracción orgánica. Incubar a temperatura ambiente 5 min.

2) Añadir 5 fmoles del spike-in Control Cel-miR39.

3) Añadir 200 μ l de cloroformo e incubar 2-3 min a T^a ambiente. Tras centrifugación (15 min a 12000 g, 4°C) se obtienen 3 fases: una superior, acuosa que contiene el ARN, una interfase y una fase orgánica inferior que engloban al ADN y las proteínas.

4) La fase superior, acuosa se extrae, y se añade etanol puro (900 μ l) lo que facilita la precipitación de las moléculas de ARN de tamaño igual o superior a 18 nucleótidos.

5) La muestra se aplica luego a la columna de centrifugación RNeasy MinElute, en la que el RNA total se une a la membrana y el fenol y otros contaminantes se eliminan. Centrifugar a >8000 g durante 15 seg a T^a ambiente. Eliminar sobrenadante. Repetir este paso una vez más.

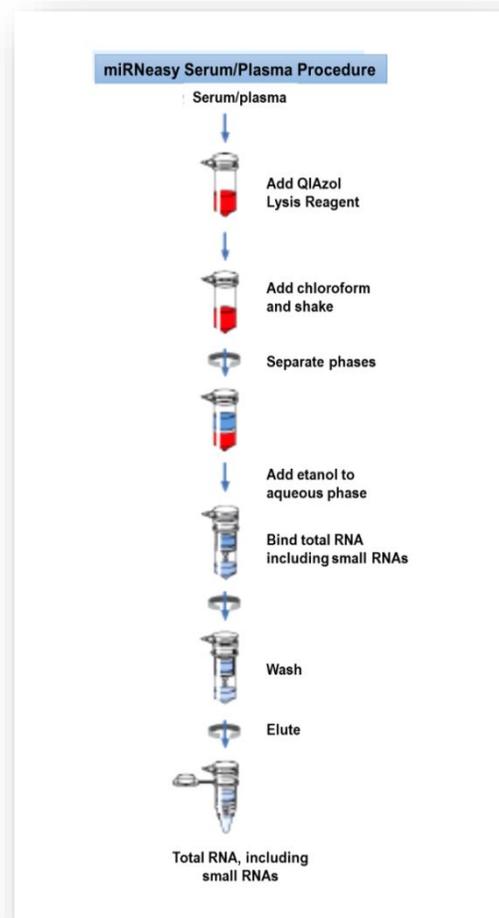


Figura 3. Esquema resumen del protocolo de extracción de RNA total de suero/plasma

6) Añadir 700 μ l de buffer RPE a la columna y centrifugar 15 seg a > 8000 g. Eliminar el sobrenadante.

7) Añadir 500 μ l de etanol al 80% y centrifugar 2 min a >8000 g. Eliminar sobrenadante.

8) Centrifugar a máxima velocidad durante 5.n min. Añadir 15 μ l de agua libre de RNAsa a 55°C. Incubar 5 min y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad para eluir el RNA.

2.3. Análisis del Perfil de expresión de los MicroRNA

Con el objetivo de identificar los cambios ocurridos en la expresión de los miRNA en el suero de pacientes tratados con terapia combinada antiTNF- α /DMARDs, utilizamos el kit *Human Serum & Plasma miRNA PCR Array* (Qiagen) (Figura 4). Este Array permite realizar un perfil de expresión de 84 miRNAs presentes en suero, plasma y otros fluidos corporales. La selección de dichos miRNAs, diseñada por Qiagen, está basada en resultados publicados que demuestran la existencia de una correlación entre los niveles de expresión de dichos miRNAs y la actividad de diversas patologías.

Para llevar a cabo el PCR-Array se realizó un pool conteniendo 2 μ l de los distintos ARNs purificados a partir del suero de 10 pacientes con AR (cohorte exploratoria) antes de iniciar el tratamiento antiTNF- α /DMARDs (T1) y otro pool idéntico con el ARN obtenido del suero de dichos pacientes tras 6 meses de tratamiento (T2).

La transcripción de los ARNs se realizó empleando el kit miScript II RT (Quiagen). Con el cDNA obtenido se llevó a cabo una PCR en tiempo real que permitía obtener el perfil de expresión de miRNAs utilizando el kit *Human Serum & Plasma miRNA PCR Array* en combinación con el kit *miScript SYBR Green PCR* (Qiagen).

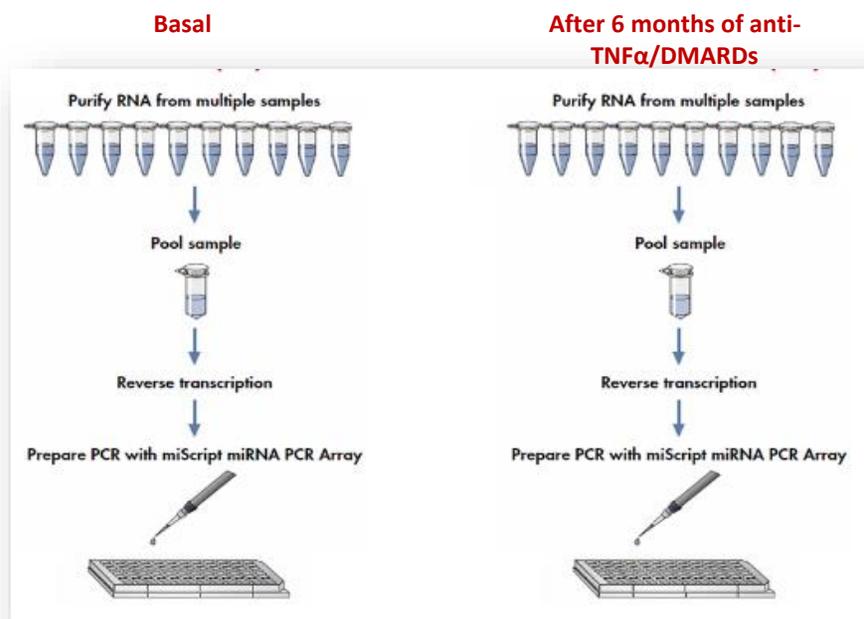


Figura 4. Esquema resumen del protocolo de análisis del perfil de expresión de los microRNA circulantes en pacientes AR tras tratamiento con Anti-TNF α /DMARDs

Protocolo

A) Retrotranscripción: miScript II RT kit

Las reacciones de transcripción reversa utilizando este kit se llevan a cabo utilizando el miScript HiSpec Buffer, un tampón que induce la retrotranscripción selectiva de miRNAs maduros y ciertos RNAs de cadena corta, tanto nucleolares como nucleares. La conversión de ARNs de cadena larga, tales como los ARNm, es suprimida.

1. Mantener el RNA purificado en hielo. Llevar a temperatura ambiente el agua libre de RNAsas, la mezcla de nucleótidos (10 x miScript Nucleics Mix) y el tampón de reacción (5 x miScript HiSpec Buffer). Centrifugar brevemente los tubos para recoger el líquido residual de las paredes y mantener en hielo.
2. Preparar la reacción de retrotranscripción (en hielo) con los siguientes componentes: 5x miScript HiSpec Buffer (4 μ l), 10X miScript Nucleics Mix (2 μ l),

agua libre de RNAsas (3 μ l), miScript Reverse transcriptase Mix (2 μ l; enzima de retrotranscripción), RNA template (9 μ l del pool de RNA realizado a partir de muestras de RNA total de 10 pacientes antes y después del tratamiento).

3. Incubar a 37°C durante 60 min.
4. Incubar a 95°C durante 5 min para inactivar la enzima de retrotranscripción. Pasar a hielo.
5. Diluir el cDNA obtenido en agua libre de RNAsas para preprar la reacción de PCR posterior (200 μ l de agua libre de RNAsas por cada 20 μ l de cDNA)

B) PCR en tiempo real para análisis del perfil de expresión de miRNAs

Esta tecnología facilita el estudio del perfil de expresión de miRNAs maduros por PCR a tiempo real, utilizando el Array miScript miRNA PCR en combinación con el kit miScript SYBR Green PCR, el cual contiene el primer universal complementario a la cola poli-A de los ARN mensajeros (miScript Universal Primer –reverse primer-) y la mezcla de detección mediante fluorescencia QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix. Dicha mezcla es aplicada a una placa de 96 pocillos que contienen 84 primers específicos para cada uno de los miRNAs maduros a analizar (-forward primer-) junto a varios controles positivos y negativos de la reacción.

1. Llevar a temperatura ambiente las distintas soluciones a emplear en la mezcla de reacción.
2. Preparar mezcla de reacción para una placa de 96 pocillos con los siguientes componentes: 2x QuantiTect SYBR Green PCT Master Mix (1375 μ l), 10 x miScript Universal Primer (275 μ l), agua libre de RNAsas (1000 μ l), cDNA previamente diluido (100 μ l).
3. Añadir la mezcla de reacción a cada pocillo de la placa de 96 pocillos incluida en el miScript miRNA Array, a razón de 25 μ l/pocillo.
4. Sellar herméticamente la placa y centrifugar durante 1 min a 1000 g (Tª ambiente) para eliminar las burbujas.
5. Programar el termociclador para realizar la PCR, de acuerdo a las siguientes condiciones de tiempo y temperatura: a) etapa inicial de activación de la PCR (15

min a 95°C, facilita la activación de la HotStarTaq Polimerasa); b) 45 ciclos incluyendo cada uno 3 etapas consecutivas de desnaturalización del cDNA (15 seg a 94°C), hibridación (30 seg a 55°C) y extensión (30 seg a 70°C); c) 45 ciclos de amplificación del cDNA.

6. Analisis de los datos utilizando el software suministrado por Qiagen, disponible en la web: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>.

Los valores de expresión relativa de los diferentes miRNAs fueron normalizadas tomando como referencia el valor del miRNA sintético Cel-miR-39 y calculados según el método de Livak & Schmittgen con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.4. Validación de los resultados obtenidos en el PCR-Array: RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

Para validar los resultados obtenidos en el Array, se seleccionaron 5 microRNAs, asociados a la patogenia de la AR y en los que la expresión relativa en T2 se había modificado en una proporción de al menos 2 veces en relación a la expresión relativa en T1. También se seleccionaron 5 miRNAs que, a pesar de no haber sufrido dicho cambio relativo, se habían asociado en estudios previos a procesos inflamatorios, patologías autoinmunes y AR. Para ello, consultamos la Human miRNA and Disease database (HMDD): <http://202.38.126.151/hmdd/mirna/md/>, la cual dispone de una extensa bibliografía en relación a los microRNAs descritos hasta la fecha y su implicación en distintas patologías. Los cambios ocurridos en la expresión de dichos miRNAs se evaluaron en todos los pacientes incluidos en el estudio (cohorte de validación).

Para llevar a cabo la retrotranscripción (RT), de los 15 μ l de muestra obtenida tras el aislamiento de RNA, se tomaron 3 μ l, a los que se aplicó el kit TaqMan miRNA Reverse Transcription kit, utilizando primers específicos de cada miRNA en horquilla o stem-loop (Life Technologies, Madrid, España) (Figura 5). La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies), con un programa de 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos. El volumen final de

15 μ l para la reacción de RT (transcriptasa inversa o reversa) incluyó 3,15 μ l de H₂O, 1,5 μ l de 10X RT Buffer, 0,2 μ l de inhibidor de RNasas, 0,15 μ l de 100Mm dNTPs con dTTP, 1 μ l de la enzima Multiscribe Reverse-Transcriptase, 1,5 μ l de cebadores RT (máximo 4 primers de miRNA en cada reacción de RT) y los 3 μ l de muestra de RNA.

El producto de la RT se diluyó posteriormente con 10 μ l de H₂O. A continuación, se mezclaron 2,5 μ l de la dilución con 5 μ l del *Taqman 2x Universal PCR Master Mix*, junto con 2,5 μ l de un pool realizado con 4 miRNAs diluidos 0,2X (*Taqman miRNA Assay*), para realizar una reacción de pre-amplificación con un volumen de 10 μ l (cada miRNA incluido en el pool se encontraba a una concentración de 0,05 X). La reacción se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems), con un programa de 95°C durante 10 min, y 20 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 4 min.

Tras la reacción de pre-amplificación, el producto se diluyó añadiendo 60 μ l de H₂O. Se tomaron 4 μ l de la dilución y se combinaron con 5 μ l de *Taqman 2x Universal PCR Master Mix*, 0,5 μ l de *Taqman miRNA Assay 20X* y 0,5 μ l de H₂O, para obtener un volumen total de 10 μ l para la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). La *PCR* en tiempo real se realizó en el termociclador LightCycler 480 de Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). El programa consistió en una fase inicial de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, usando el el kit *Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems, San Francisco, CA, EEUU).

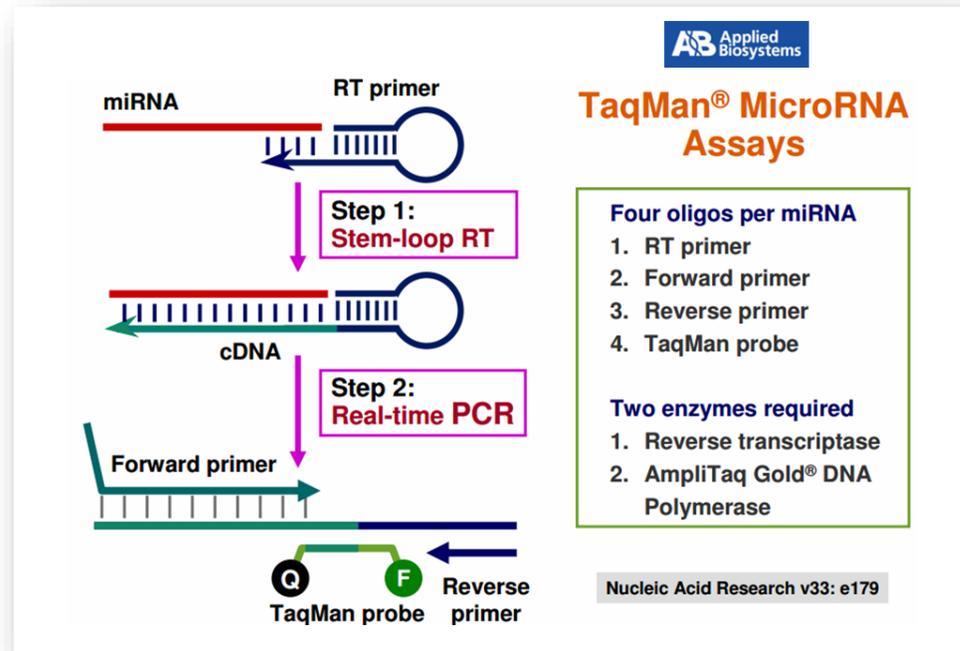


Figura 5. Esquema resumen del protocolo de análisis de RT-PCR utilizado para validar los miRNAs expresados diferencialmente en pacientes AR tras tratamiento con Anti-TNF α /DMARDs

Los resultados de la PCR fueron normalizados tomando como referencia el valor del miRNA sintético Cel-miR-39 y calculados según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores de la Ct media del Cel-miR-39 en los grupos en el T1 y T2 fueron 16.10 y 16.20, respectivamente. Se usó el software BestKeeper para evaluar si este miRNA era considerado un buen miRNA de referencia [189]. El valor de desviación típica de la media de los datos para dicho miRNA control se halló inferior a 1, lo que nos permitió validar al Cel-miR-39 como un miRNA de referencia apropiado en nuestras condiciones experimentales.

3. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media) o media \pm SD (desviación típica de la media). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos fueron agrupados y analizados mediante una prueba paramétrica (Test t de Student) en aquellas muestras con distribución normal y medias con desviaciones estandar similares, o mediante una prueba no paramétrica (Mann-Whitney Rank Sum Test) en el caso de no superar los test de normalidad y/o igualdad de varianza. El análisis de las muestras apareadas para los sujetos antes y después del tratamiento se compararon utilizando el test de Wilcoxon (*Wilcoxon signed-rank test*). Las diferencias en los parámetros evaluados entre los grupos de tratamiento se analizaron mediante un Análisis de Covarianza, dado que se encontraron diferencias en el T1 entre los distintos tratamientos, para comparar las diferencias en el T2 corregidas por las diferencias observadas en el T1. Las diferencias intragrupo se analizaron con una prueba ANOVA para medidas repetidas. Para evaluar las diferencias Los análisis de correlación se realizaron utilizando la prueba de correlación bivariada de Pearson y los estudios de asociación mediante el test Chí-cuadrado. El nivel de significación estadística considerado fue al menos del 95% ($p < 0,05$).

Realizamos un análisis de curvas ROC (Receiver operating characteristic curve analyses) para valorar la fiabilidad de los cambios observados en los niveles de miRNA en suero, representando la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) vs la tasa de falsos positivos (especificidad) a varios niveles de corte. Las áreas bajo la curva (AUCs) se calcularon utilizando el programa SPSS. Realizamos también análisis ROC para encontrar la combinación de miRNA con mayor capacidad de predicción de respuesta a tratamiento, así como para identificar aquellos que podrían actuar como biomarcadores potenciales de respuesta a la terapia combinada. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $P < 0.05$.

Resultados

5. RESULTADOS

1. Respuesta clínica a la terapia combinada antiTNF- α /DMARDs

Al inicio de la terapia con antiTNF- α todos los pacientes presentaban una alta actividad de la enfermedad, reflejada por una media de DAS28 de 5.73 (5.29-6.11), a pesar de recibir tratamiento concomitante con DMARDs (número medio de DMARDs previo al inicio del tratamiento 2.7). Los pacientes presentaban una media de evolución de la enfermedad de 10.4 años, por tanto, la mayoría de los pacientes presentaban una forma establecida de la enfermedad. Todos los pacientes tomaban AINEs (fármacos anti-inflamatorios no esteroideos) diariamente y el 65% de ellos recibieron además tratamiento con esteroides (rango 5-15 mg/día de prednisona). Respectal uso de DMARDs, todos los pacientes estaban en tratamiento con, al menos, un DMARD, siendo la media de 1.84 \pm 0.5. El 68.4% de los pacientes estaban recibiendo metotrexato de forma concomitante, siendo la dosis media 13.1 \pm 9 mg semanales. En la Tabla 1 se presenta el tratamiento de los pacientes, incluidos losDMARDs.

La respuesta clínica se evaluó según los criterios de respuesta EULAR basados en el DAS28 basal y el cambio del mismo tras el tratamiento, tal y como se describe en el apartado de Material y métodos. El 89.5% de los pacientes mostraron respuesta satisfactoria a la terapia combinada anti-TNF- α /DMARDs (Pacientes Respondedores), con un 18.9% en remisión clínica de la enfermedad, definido por los criterios de DAS28, tal y como se describe en el apartado Materiales y métodos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (prueba Chi cuadrado, datos no mostrados).

Todos los parámetros clínicos, incluido los contajes articulares como los índices de actividad (DAS28, SDAI) mejoraron de forma significativa tras el tratamiento en el grupo de pacientes respondedores. Entre los parámetros serológicos y de autoinmunidad analizados, el FR, la PCR y VSG y los niveles de IL16, IL17, y TNF- α se redujeron de forma significativa a los 6 meses de tratamiento en los pacientes respondedores respecto a los pacientes no respondedores. El resto de citoquinas inflamatorias como la IL23, IL22 e IL4 presentaron una tendencia a la reducción, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Sin embargo, los niveles de TNFR2, MCP1 y VEGF no variaron prácticamente e incluso aumentaron ligeramente (Tabla 2). En base a dichos resultados, consideramos este periodo

de tratamiento apropiado para observar una respuesta clínica satisfactoria, por lo que fue el periodo seleccionado para evaluar los cambios ocurridos en el perfil de miRNAs. El HAQ se redujo significativamente de forma similar en ambos grupos de tratamiento.

Tabla 2. Cambios operados en parámetros clínicos y serológicos tras 6 meses de tratamiento con anti-TNF α /DMARDs en pacientes AR respondedores y no respondedores

	Respondedores (N = 85)			Non-Respondedores (N = 10)		
	Basal	Tratamiento TNF- α /DMARDs	P	Basal	Tratamiento TNF- α /DMARDs	P
Parámetros clínicos						
<i>TJC</i>	15.9 \pm 4.8	5.1 \pm 2.2	0.000	15.6 \pm 5.1	8.5 \pm 2.9	0.005
<i>SJC</i>	11.7 \pm 3.9	2.9 \pm 1.8	0.000	11.6 \pm 4.9	5.1 \pm 2.7	0.005
<i>DAS28</i>	5.8 \pm 0.6	3.3 \pm 0.7	0.000	5.5 \pm 0.7	4.3 \pm 0.6	0.005
<i>SDAI</i>	36.3 \pm 11.4	2.9 \pm 6.8	0.000	39.2 \pm 11.8	5.7 \pm 12.1	0.005
<i>HAQ</i>	2.1 \pm 0.3	1 \pm 0.4	0.000	2.1 \pm 0.3	1 \pm 0.3	0.008
Parámetros Serológicos						
VSG (mm/h)	56.4 \pm 17.2	27.9 \pm 18.5	0.000	51.4 \pm 11.9	37.6 \pm 19.3	ns
PCR (mg/L)	3.9 \pm 2.1	1.5 \pm 1.2	0.000	2.2 \pm 0.8	2.5 \pm 0.9	ns
FR (U/L)	155.2 \pm 288.3	85.4 \pm 241	0.000	61.2 \pm 84.3	20.8 \pm 39.9	0.027
IL-6 (pg/mL)	9.4 \pm 46.7	1.4 \pm 6.8	0.000	2.1 \pm 5.6	0	ns
TNF(pg/mL)	14.9 \pm 28.8	5.7 \pm 6.1	0.038	4.1 \pm 4.5	4.7 \pm 5.1	ns
sTNFRII (pg/mL)	1.5 \pm 0.9	1.5 \pm 0.7	ns	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.7	ns
MCP1 (pg/mL)	1174.8 \pm 1615.4	1216.4 \pm 1655.4	ns	740 \pm 504.6	678.6 \pm 221.8	ns
VEGF (pg/mL)	1107.7 \pm 1360.9	830.3 \pm 570.1	ns	796.7 \pm 462.7	1077.9 \pm 711.6	ns
IL23 (pg/mL)	115 \pm 235.5	76.8 \pm 132.9	ns	41.2 \pm 30.5	223.5 \pm 424.8	ns
IL22 (pg/mL)	46.3 \pm 112	17.2 \pm 29.2	ns	8.4 \pm 8.1	104.9 \pm 193.3	ns
IL17 (pg/mL)	4.8 \pm 8.5	2.1 \pm 2.1	0.024	11.9 \pm 19.1	1.4 \pm 1.4	ns
IL4 (pg/mL)	22.8 \pm 17.6	14.9 \pm 16.2	ns	4.2 \pm 6	12.8 \pm 18.2	ns

T1 = baseline, T2 = at 6 months, TJC = Tender Joint Count, SJ = Swolen Joint Count, DAS28 = Disease Activity Score, SDAI = Simplified Disease Activity Index, HAQ = Health Assessment Questionnaire, ESR = Erythrocyte sedimentation rate, CRP = C-reactive protein, RF = Rheumatoid Factor, IL-6 = Interleukin 6, TNF = Tumor necrosis factor, sTNFRII = Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Type II, MCP-1 = Monocyte chemoattractant Protein-1; VEGF = vascular endothelial growth factor, IL-23 = Interleukin 23, IL-22 = Interleukin 22, IL-17 = Interleukin 17, IL-4 = Interleukin 4.

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de respuesta o remisión entre los tres tipos de tratamiento antiTNF α administrados, IFX, ETA y ADA (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Cambios operados en parámetros clínicos y serológicos tras el tratamiento con diferentes fármacos anti-TN-F α en pacientes AR. Cohorte de Validación

		TJC	SJC	DAS28	SDAI	HAQ	VSG (mm/h)	PCR (mg/L)	FR (U/L)
Todos los pacientes	T1	15.7 \pm 4.6	11.5 \pm 3.8	5.7 \pm 0.6	36.3 \pm 10.9	2.1 \pm 0.3	55.9 \pm 16.6	3.8 \pm 2.1	114.1 \pm 172.5
	T2	5.5 \pm 2.6	3.2 \pm 2.2	3.4 \pm 0.8	3.4 \pm 7.6	1 \pm 0.4	29.4 \pm 19.4	1.6 \pm 1.2	52.9 \pm 108.4
	P*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Pacientes tratados con INFLIXIMAB (N=46)	T1	15.4 \pm 4.3	11.1 \pm 3.6	5.7 \pm 0.5	35.3 \pm 10.1	2.1 \pm 0.2	56 \pm 17.7	3.9 \pm 2.2	100 \pm 148.1
	T2	5.5 \pm 2.4	3 \pm 1.9	3.5 \pm 0.7	2.6 \pm 6.6	1 \pm 0.3	28.5 \pm 18.9	1.6 \pm 1.3	41.9 \pm 76.8
	P**	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Pacientes tratados con ETANERCEPT (N=24)	T1	16.9 \pm 5.1	12.6 \pm 4.1	5.8 \pm 0.6	38.3 \pm 12.4	2 \pm 0.4	55.6 \pm 14.3	3.9 \pm 2.2	169.3 \pm 241.5
	T2	5.7 \pm 2.7	3.7 \pm 2.5	3.6 \pm 0.9	5 \pm 9.8	1.1 \pm 0.4	25.4 \pm 16.8	1.6 \pm 1.3	85.9 \pm 165.1
	P**	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Pacientes tratados con ADALIMUMAB (N=15)	T1	14.8 \pm 4.2	10.9 \pm 3.6	5.5 \pm 0.6	35.8 \pm 11.1	2 \pm 0.4	56.2 \pm 18.3	3.2 \pm 1.9	68.8 \pm 64.2
	T2	5.1 \pm 3	2.8 \pm 2.4	3.2 \pm 0.9	3.5 \pm 7	0.9 \pm 4.8	38.4 \pm 23	1.4 \pm 1.1	33.6 \pm 63.9
	P**	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.006	0.160

*p<0.05 vs T1 (Wilcoxon test); **p<0.05 vs T1 (ANOVA de medidas repetidas)

Pacientes en tiempo basal (T1) y tras 6 meses de tratamiento (T2)

Tabla 4. Analisis comparativos entre grupos de tratamiento. Cohorte de validación.

	TJC	SJC	DAS28	SDAI	HAQ	VSG (mm/h)	PCR (mg/L)	FR (U/L)
Infliximab vs Etanercept*	0.920	0.406	0.810	0.283	0.726	0.531	0.955	0.645
Infliximab vs Adalimumab*	0.699	0.739	0.557	0.707	0.717	0.081	0.500	0.608
Etanercept vs Adalimumab*	0.788	0.351	0.480	0.625	0.547	0.051	0.570	0.916

*p<0.05 (ANOVA de medidas repetidas)

2. Perfil de miRNAs expresados diferencialmente en el suero de pacientes con AR tras terapia combinada antiTNF- α /DMARDs.

El análisis de los datos obtenidos en el miRNA PCR-Array, evaluados utilizando el software proporcionado online por la casa comercial (Qiagen) permitió obtener el valor de expresión relativa para cada uno de los 84 miRNAs incluidos en el Array; con dicho valor se calculó la tasa de cambio de expresión (*fold-change*) de los mismos en respuesta tras 6 meses de tratamiento (T2) frente al valor basal (T1) (Figuras 2 y 3).

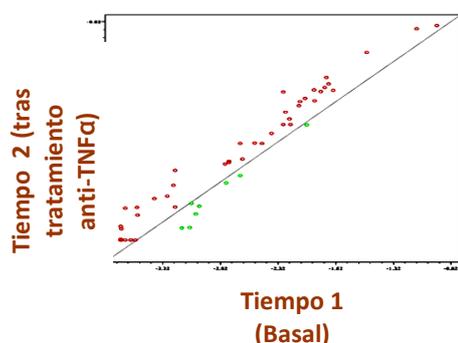


Figura 2. Scatter Plot de los miRNAs presentes en el PCR-Array. Se representan en rojo el conjunto de miRNAs cuya expresión relativa aumenta tras el tratamiento y en verde el conjunto de miRNAs cuya expresión relativa disminuye.

Aproximadamente un 90.1% de los miRNAs se hallaron incrementados, mientras que el 9.9% se redujeron en respuesta a la terapia.

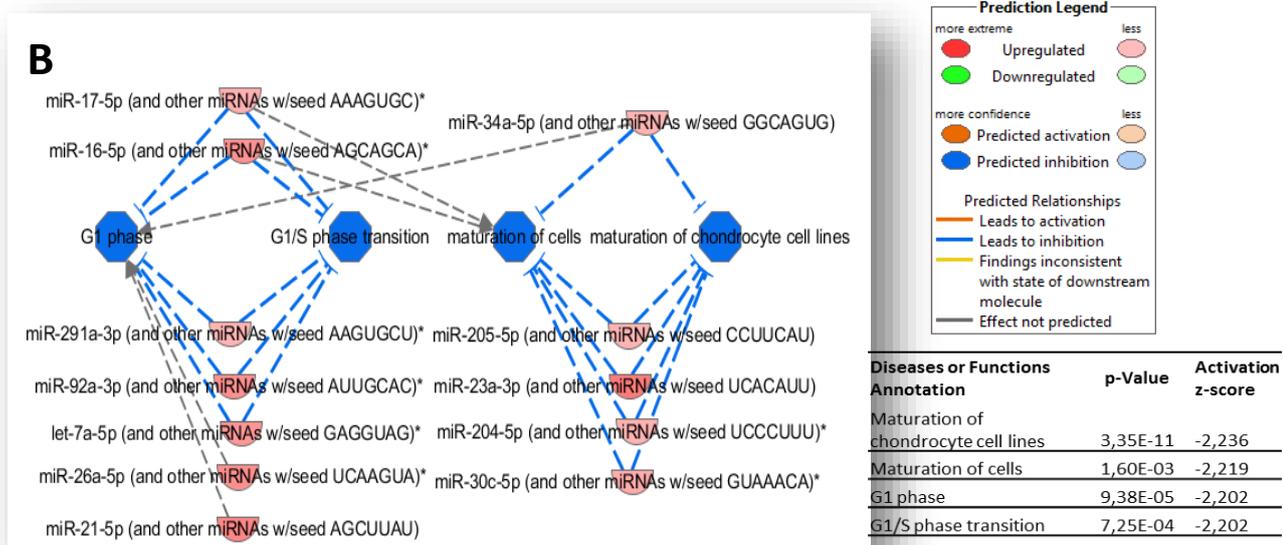
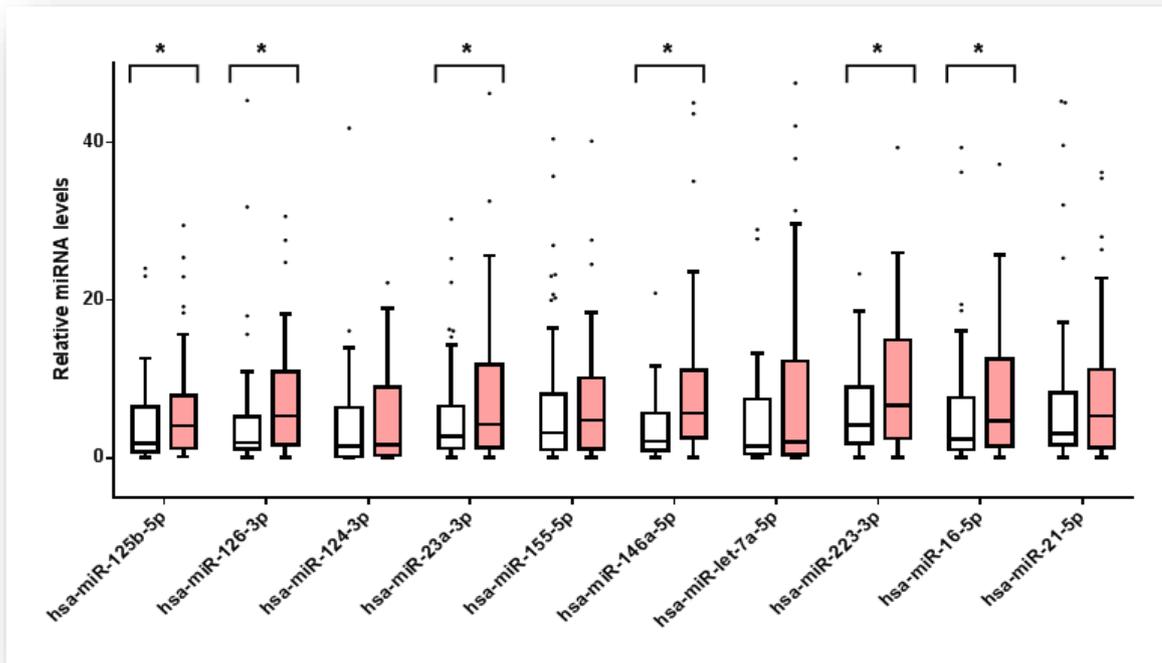


Figura 4. Interrelación entre miRNAs alterados en el PCR-Array y procesos fisiopatológicos asociados. Los microRNAs modificados tras terapia combinada junto con el fold-change observado, se analizaron utilizando el software IPA, con el fin de hallar sus interrelaciones con genes diana y efecto potencial en rutas moleculares específicas.

3. Validación de los miRNA diferencialmente expresados

Para validar los datos obtenidos en el PCR Array, se seleccionaron 5 miRNAs que mostraban un incremento de expresión relativa mayor o igual a 2 tras el tratamiento (hsa-miR-125b, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-3p y hsa-miR-146a-5p). Se seleccionó también para su validación un segundo grupo de 5 miRNAs con un incremento inferior a 2 veces, pero con una asociación demostrada en numerosos estudios previos a procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes, incluyendo la AR (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-124a-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-223-3p).

Los cambios ocurridos en la expresión de dichos miRNAs fueron evaluados en todos los pacientes incluidos en el estudio (cohorte de validación). En la población total, 6 de los 10 miRNAs (hsa-miR-125b, hsa-miR-126-3p, hsa-miR146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-23-3p, y hsa-miR-223-3p) se encontraron significativamente aumentados tras el tratamiento con terapia combinada anti-TNF- α /DMARDs. Los 4 miRNAs restantes (hsa-miR23a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-let7a-5p y hsa-miR-155-5p) también se hallaron incrementados, pero no



alcanzaron la significación estadística (Figura 5).

Figura 5. Expresión relativa de los microRNAs seleccionados al inicio (T1) y tras 6 meses de tratamiento anti-TNF- α /DMARDs (T2) en la cohorte de validación (n= 85). Se muestran los niveles de expresión relativa de los microRNAs. Las cajas indican intervalos entre los percentiles 25 y 75; las barras horizontales dentro de las cajas indican la mediana. Los puntos negros fuera de las cajas indican valores fuera de los rangos de percentil indicados. *P<0.05.

Estas diferencias se demostraron incluso más significativas cuando analizamos los datos en función de la respuesta a la terapia, entre los pacientes Respondedores y No Respondedores, de forma que mientras los niveles de expresión de los miRNAs evaluados aumentaron fuertemente en los Respondedores, no cambiaron en los No Respondedores después del tratamiento (Figura 6). Además, en los Respondedores, observamos un cambio paralelo en los niveles de expression de parametros de autoinmunidad tales como FR y algunas citoquinas tales como TNF- α , IL-6 o IL-17, niveles que se redujeron significativamente después del tratamiento. (Tabla 2).

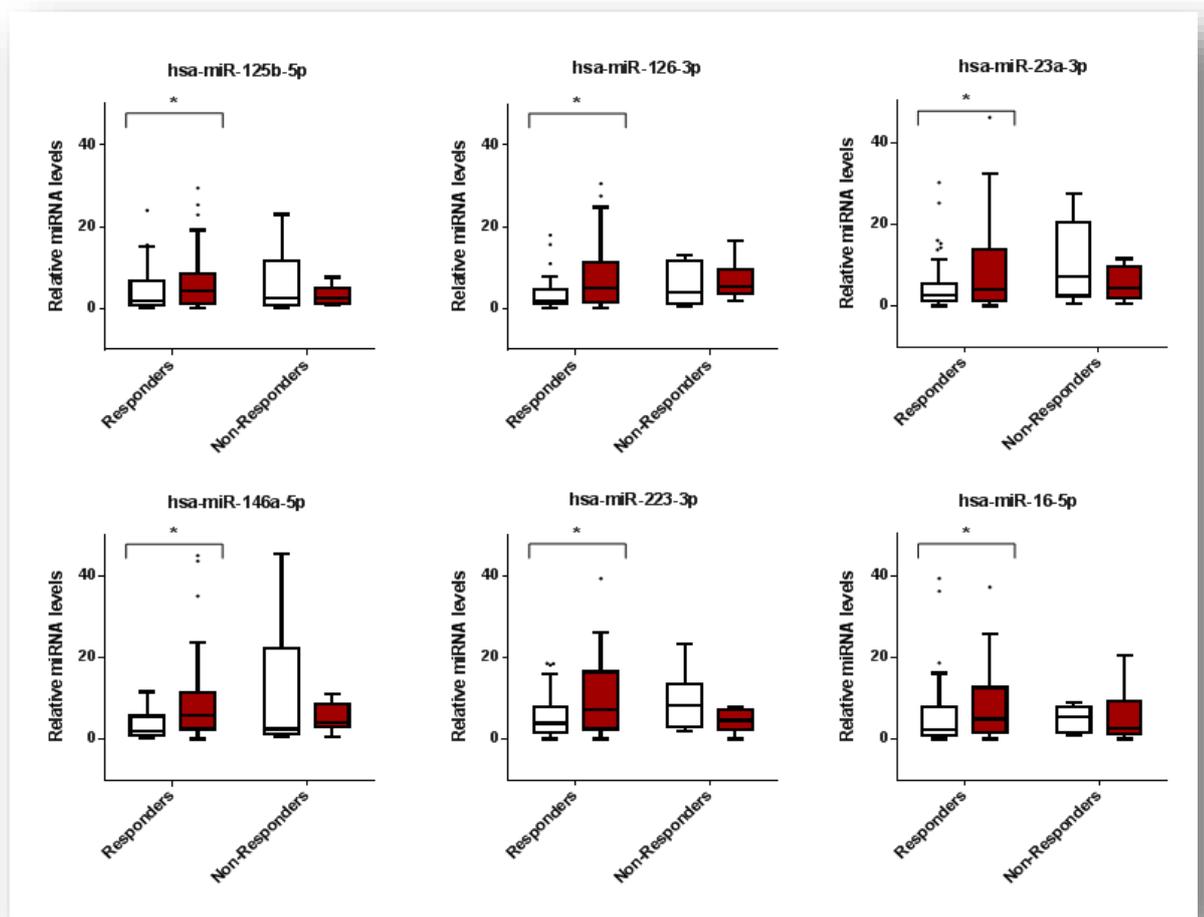


Figura 6. Análisis comparativo de los niveles de miRNAs entre pacientes Respondedores y No respondedores al inicio (T1) y tras 6 meses de tratamiento anti-TNF- α /DMARDs (T2). Se muestran los niveles de expresión relativa de los microRNAs. Las cajas indican intervalos entre los percentiles 25 y 75; las barras horizontales dentro de las cajas indican la mediana. Los puntos negros fuera de las cajas indican valores fuera de los rangos de percentil indicados. *P<0.05.

Los cambios ocurridos en la expresión de la mayoría de dichos miRNAs se demostraron estadísticamente significativos sólo en pacientes tratados con IFX, pero no en aquellos que recibieron ETA o ADA. Es importante no obstante subrayar que en todos los

casos se observó la misma tendencia de cambio, por lo que la ausencia de significación estadística podría deberse al hecho de que un menor número de pacientes habían recibido ETA o ADA, lo que podría redundar en un aumento en la desviación típica que prelude la significación (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Cambios ocurridos en los miRNAs validados en respuesta al tratamiento con diferentes fármacos anti-TNF α en pacientes AR. Cohorte de Validación

miRNA		hsa-miR-125b	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-223-3p
Todos los pacientes	T1	4.5 \pm 5.2	4.8 \pm 5.9	5.9 \pm 10.1	5.4 \pm 11.8	5.7 \pm 9.2	5.6 \pm 5.6
	T2	11.4 \pm 32.3	11.6 \pm 18.3	11.2 \pm 18.4	8.5 \pm 9.1	9.5 \pm 12.1	9.7 \pm 8.6
	<i>P</i> *	0.009	0.007	0.001	0.001	0.017	0.014
Pacientes tratados con INFLIXIMAB (N=46)	T1	5.6 \pm 6.1	5.4 \pm 5.1	4.1 \pm 4.4	5.7 \pm 15.7	6.9 \pm 9.4	7.3 \pm 6.4
	T2	10.3 \pm 11.5	14.8 \pm 21.7	14.1 \pm 23.1	9.3 \pm 8.8	12.3 \pm 11.1	12.1 \pm 8.2
	<i>P</i> **	0.421	0.014	0.008	0.146	0.058	0.019
Pacientes tratados con ETANERCEPT (N=24)	T1	1.9 \pm 2.7	1.6 \pm 1.5	4.2 \pm 10.3	3.6 \pm 4.6	2.2 \pm 5.4	2.8 \pm 2.7
	T2	2.9 \pm 3.2	4.8 \pm 10.7	4.7 \pm 4.8	5.9 \pm 7.7	3.1 \pm 4.9	5.8 \pm 7.3
	<i>P</i> **	0.888	0.607	0.919	0.479	0.827	0.236
Pacientes tratados con ADALIMUMAB (N=15)	T1	5.6 \pm 4.5	8.9 \pm 9.2	13.7 \pm 16.6	8.7 \pm 6.3	8.7 \pm 12.8	5.6 \pm 5.8
	T2	17.4 \pm 11.9	14.8 \pm 17.2	13.8 \pm 16.6	12.3 \pm 11.6	13.9 \pm 18.6	10.3 \pm 10.5
	<i>P</i> **	0.022	0.305	0.984	0.944	0.732	0.684

p*<0.05 vs T1 (Wilcoxon test); *p*<0.05 vs T1 (ANOVA de medidas repetidas)

Pacientes en tiempo basal (T1) y tras 6 meses de tratamiento (T2)

Tabla 6. Análisis comparativos entre grupos de tratamiento. Cohorte de validación.

miRNA	hsa-miR-125b	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-223-3p
-------	--------------	----------------	----------------	-----------------	---------------	----------------

Infliximab vs Etanercept*	0.434	0.067	0.091	0.194	0.009	0.021
Infliximab vs Adalimumab*	0.117	0.945	0.842	0.249	0.793	0.378
Etanercept vs Adalimumab*	0.045	0.184	0.285	0.047	0.027	0.325

*P<0.05 (ANOVA de medidas repetidas)

4. Identificación de los posibles mecanismos fisiopatológicos regulados por los miRNAs circulantes diferencialmente expresados en respuesta a la terapia antiTNF- α /DMARDS

Ha sido ampliamente probado que los miRNAs modifican la expresión génica mediante la represión de la traducción de proteínas específicas o a través de la degradación de sus ARNm diana. Por tanto, la modulación de su expresión podría tener un efecto directo sobre numerosos mecanismos fisiopatológicos. Con esta premisa, mediante el uso del software IPA (*Ingenuity pathway analysis*), realizamos la búsqueda de los genes diana de los 6 miRNAs validados, y analizamos su participación en diferentes rutas de transducción de señales. Dicho análisis identificó entre los genes diana modulados por los citados miRNAs aquellos implicados en la patogénesis de la AR (i.e. genes reguladores de la actividad de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la AR, así como de osteoblastos, osteoclastos y condrocitos, y los moduladores de la expresión de IL-17 en AR). Identificamos también como dianas genes moduladores de rutas asociadas a la señalización de STAT-3 o IL-6 (ambos cruciales para la inducción y el mantenimiento del estatus inflamatorio presente en pacientes AR) (Figura 7).

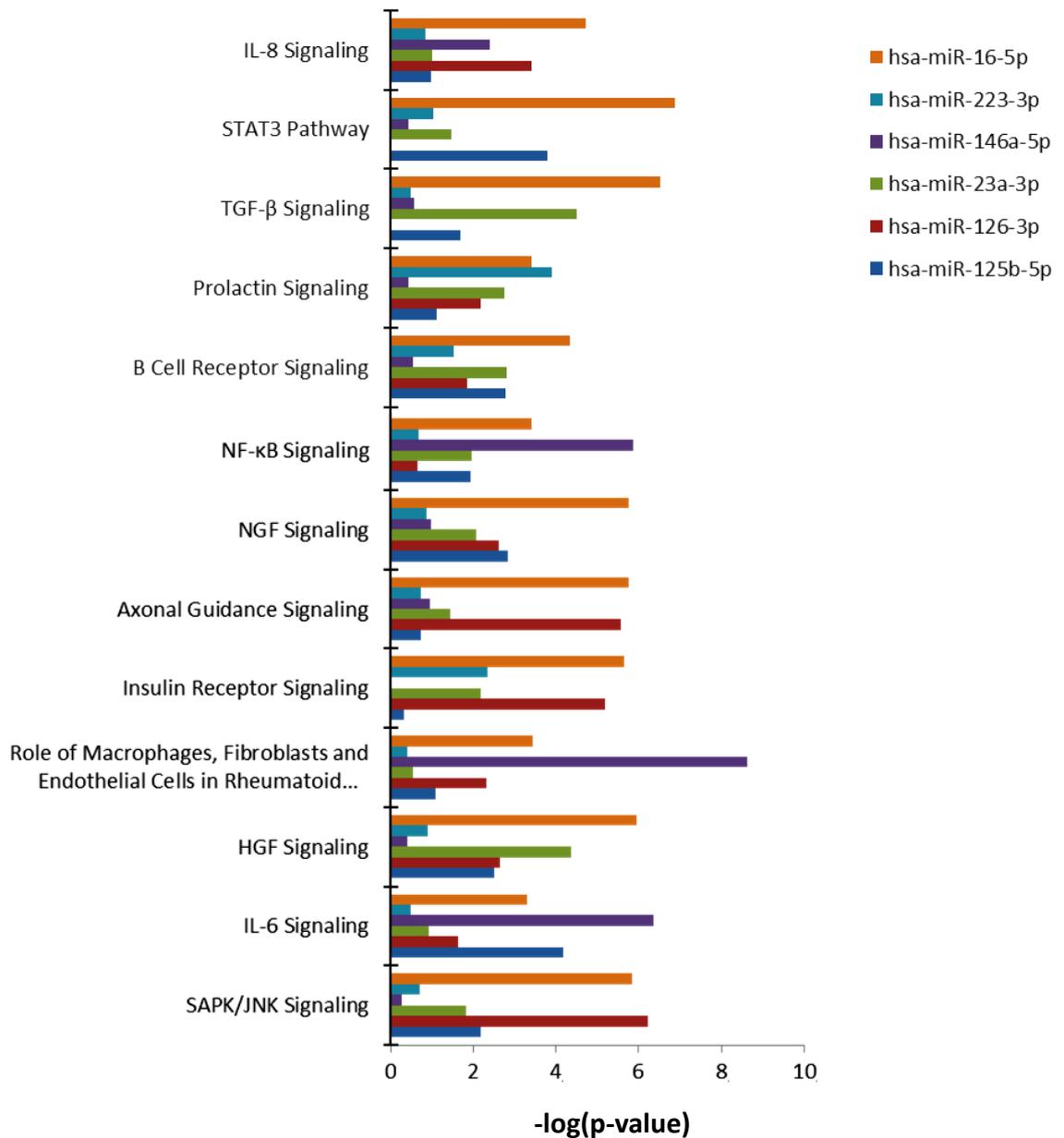


Figura 7. Papel de los miRNAs validados en la regulación de diferentes rutas canónicas asociadas a la patogenia de la AR. La gráfica muestra sólo las rutas canónicas con un IPA score >2 [$-\log(p\text{-value})$].

Una vez identificadas las principales rutas moleculares reguladas por los miRNAs validados en el presente estudio, nos propusimos profundizar en el conocimiento de su implicación directa en procesos celulares y moleculares asociados a la AR. Un análisis más profundo de las dianas de dichos miRNAs demostró que diversas rutas canónicas asociadas a la AR pueden encontrarse reguladas a distintos niveles (Figuras 8,9 y 10)

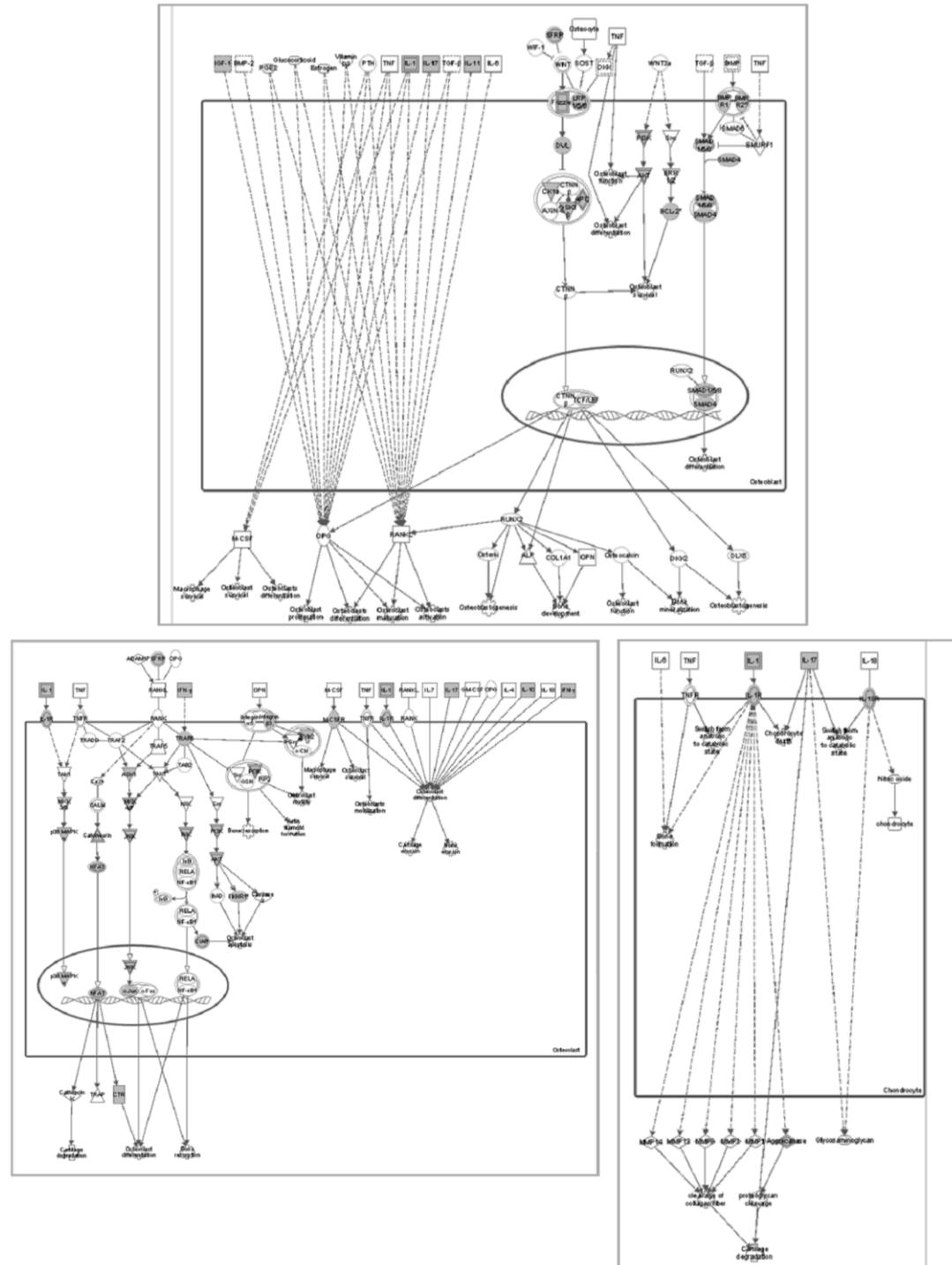


Figura 9. Distribución de los genes potencialmente modificados por los miRNAs validados, integrados en las rutas moleculares asociadas a la actividad de osteoblastos, osteoclastos y condrocitos en la Artritis reumatoide. Las moléculas reguladas se representan en gris.

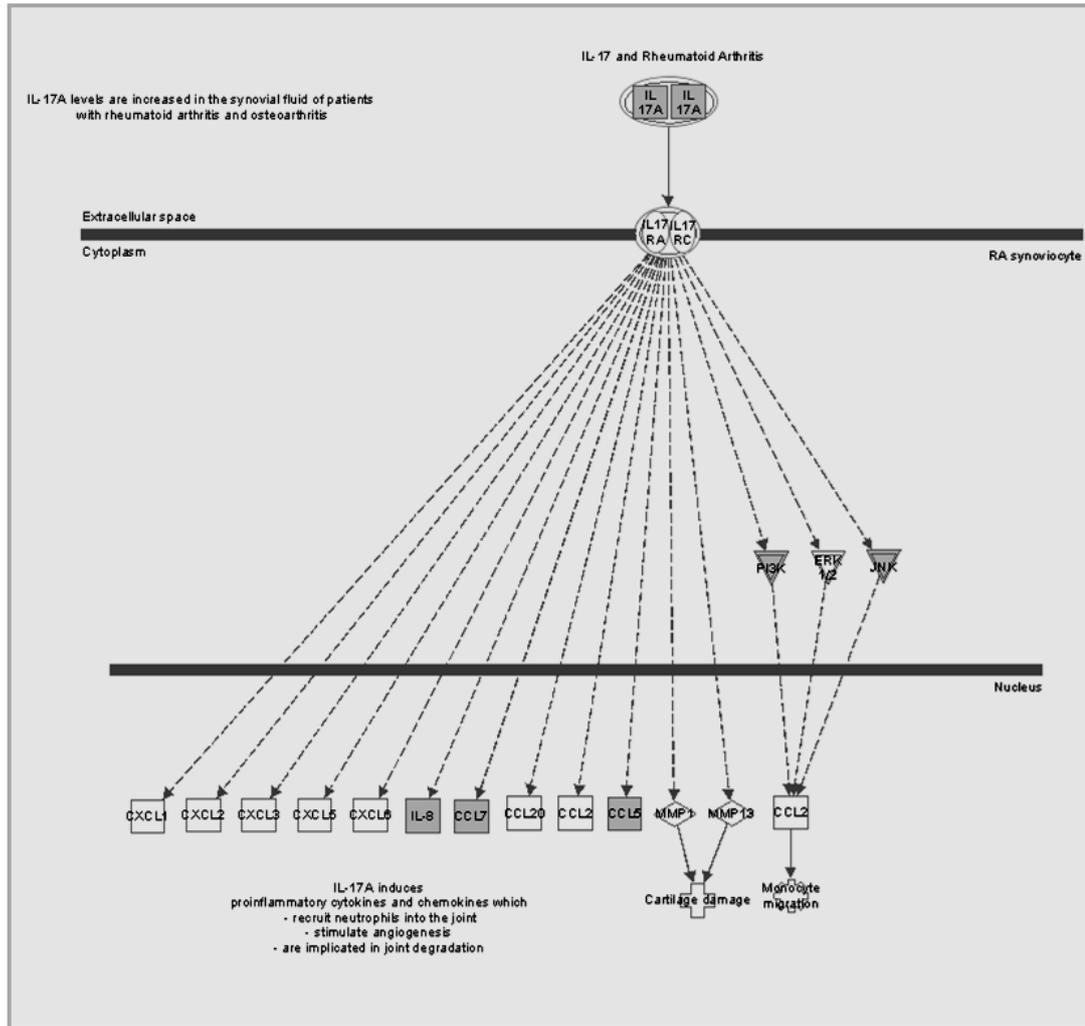


Figura 10. Distribución de los genes potencialmente modificados por los miRNAs validados, integrados en las rutas moleculares asociadas a la ruta de activación y efecto de la IL-17 en la Artritis reumatoide. Las moléculas reguladas se representan en gris.

Es importante reseñar asimismo que en el presente estudio hemos identificado diversos genes que son dianas de más de uno de los miRNAs validados (Tabla 7). Por ejemplo, el gen que codifica para CHUK (*Conserved hélix-loop-helix ubiquitous kinase or inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha, or IKK-1*), una proteína quinasa mediadora de la fosforilación de IKK y de este modo reguladora de la expresión de numerosos genes inflamatorios, podría ser modulado simultáneamente por cuatro de los 6 miRNAs. Asimismo, otros genes asociados a la AR son dianas múltiples para dichos miRNAs, tales como el receptor de la IL-6 alfa y beta, el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2, y el receptor tipo II de la proteína morfogénica de hueso. Es más, algunos de los miRNAs y sus ARNm dianas, identificados en el análisis IPA realizado, se hallaron alterados de forma complementaria e inversa en nuestra cohorte de pacientes en respuesta a la terapia

combinada anti-TNF α /DMARDs (i.e. por ej los niveles de IL-6 e IL-17 y sus miRNA reguladores, tales como, miR-23, miR-223, miR-125b o miR-126).

Tabla 7. Potenciales genes diana de los miRNAs validados asociados a la patogenia de la Artritis Reumatoide

a) Genes asociados al papel de los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la Artritis Reumatoide.

miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
--	APC	APC	--	--	--	Adenomatous polyposis coli
--	--	--	--	CCND1	CCND1	Cyclin D1
CHUK	CHUK	--	--	CHUK	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
--	FGF2	--	--	FGF2	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
--	FZD4	--	--	FZD4	FZD4	Frizzled class receptor 4
IL36B	--	--	--	--	IL36B	Interleukin 36, beta
IL-36RN	--	--	--	--	IL36RN	Interleukin 36 receptor antagonist
--	--	IL6R	--	IL6R	--	Interleukin 6 receptor
--	IL6ST	--	--	IL6ST	--	Interleukin 6 signal transducer
IRAK2	--	--	--	--	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
--	--	--	LRP6	--	LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
--	PIK3C2A	--	--	PI3KC2A	--	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
--	--	PI3KCD	PI3KCD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
PRKCE	PRKCE	--	--	PRKCE	--	Protein kinase C, epsilon

b) Genes asociados al papel de los osteoblastos, osteoclastos y condrocitos en la Artritis Reumatoide.

miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
--	--	--	--	ADAMTS5	ADAMTS5	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5
--	APC	APC	--	--	--	Adenomatous polyposis coli
--	--	BCL2	--	BCL2	BCL2	B-cell LL/lymphoma 2
--	--	BMPR2	--	BMPR2	--	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
CHUK	CHUK	--	--	CHUK	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
--	FOXO1	--	--	--	FOXO1	Forkhead box 01
--	FZD4	--	--	FZD4	FZD4	Frizzled class receptor 4
IL1F10	--	IL1F10	--	--	--	Interleukin 1 family, member 10 (theta)
IL36B	--	--	--	--	IL36B	Interleukin 36, beta
IL36RN	--	--	--	--	IL36RN	Interleukin 36 receptor antagonist
--	--	--	LRP6	--	LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
--	PIK3C2A	--	--	PIK3C2A	--	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
--	--	PI3KCD	PI3KCD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
XIAP	XIAP	--	--	--	--	X-linked inhibitor of apoptosis

c) Genes asociados al papel de la IL-17A en la Artritis Reumatoide

miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
PIK3CD	--	--	PIK3CD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta

Se muestran en la tabla sólo los genes regulados por al menos dos de los miRNAs validados

5. Las modificaciones ocurridas en los niveles de miRNAs se asocian a los cambios promovidos en las variables clínicas de los pacientes con AR en respuesta a la terapia combinada antiTNF- α /DMARDs.

Para evaluar el posible papel de los miRNAs séricos como biomarcadores de la patogénesis de la AR y de la respuesta a terapia, investigamos la correlación de los miRNAs validados con variables clínicas e inflamatorias. Los cambios observados en 3 miRNAs (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-3p y hsa-miR-16-5p) correlacionaron significativamente con los cambios observados en parámetros clínicos como el DAS28, y cinco de ellos con los cambios observados en parámetros inflamatorios tales como PCR y VSG (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-126-3p y hsa-miR-23-3p) (Tabla 8 y Figura 11). Se demostró también la existencia de una relación directa y significativa entre todos los miRNAs (datos no mostrados). De la misma forma, como se ha descrito previamente, el análisis IPA identificó redes específicas que demostraban interrelaciones entre sus dianas, directamente asociados a la patogenia de la AR.

Tabla 8. Análisis de correlación entre los miRNAs validados y diversos parámetros clínicos, inmunológicos e inflamatorios en suero de pacientes con AR

		hsa-miR-146 ^a	hsa-miR-125b	hsa-miR-126a	hsa-miR-21	hsa-miR-23a	hsa-miR-223a	hsa-miR-16
TJC	Rho-Spearman	-0,224	-0.135	-0,394	-0.97	-0.122	-0,328	-0,423
	P	0,006	0.104	0.001	0.255	0.150	0,011	0.001
SJC	Rho-Spearman	-0,270	-0,178	-0,362	-0.114	-0.122	-0,329	-0,418
	P	0.001	0.032	0.002	0.181	0.151	0,011	0.001
SDAI	Rho-Spearman	-0,254	-0.106	-0,360	-0.097	-0.126	-0,301	-0,38
	P	0,002	0.201	0.002	0.255	0.138	0,021	0.003
HAQ	Rho-Spearman	-0,215	-0.071	-0,301	-0.018	-0.065	-0,27	-0,331
	P	0.009	0.394	0.011	0.832	0.445	0,03	0,010
DAS28	Rho-Spearman	-0,295	-0.141	-0,373	-0.114	-0.123	-0,360	-0,428

	P	0,01	0.089	0.001	0.179	0.147	0,005	0.001
RF	Rho-Spearman	-0,238	-0,289	-0.204	-0.016	-0.063	-0.106	-0.197
	P	0.004	0,000	0.088	0.853	0.459	0.426	0.131
ESR	Rho-Spearman	-0,260	-0,16	-0,255	-0.096	-0.124	-0.235	-0,317
	P	0,001	0,03	0.033	0.259	0.143	0.076	0,015
PCR	Rho-Spearman	-0,152	-0.152	-0.202	-0.129	-0.081	-0,363	-0,421
	P	0.06	0.068	0.090	0.128	0.342	0,005	0.001
IL-6	Rho-Spearman	-0.160	-0.160	-0.075	-0.100	-0.115	0.253	0.071
	P	0.05	0.054	0.533	0.240	0.173	0.053	0.587
IL-4	Rho-Spearman	-0.014	-0.112	-0.395	-0.265	-0.384	-0.282	-0.251
	P	0.941	0.563	0.034	0.165	0.04	0.215	0.272
IL-23	Rho-Spearman	0.114	-0.026	-0.043	-0.033	-0.029	0.078	0.261
	P	0.330	0.795	0.727	0.751	0.776	0.562	0.047

Correlaciones mediante análisis bivariado prueba de Spearman. En rojo se muestran los coeficientes de correlación que alcanzaron la significación estadística.

TJC=Tender Joint Count, SJ=Swolen Joint Count, HAQ=Health Assessment Questionnaire, DAS28=Disease Activity Score, . RF=Reumatoid Factor, ESR= Erythrocyte sedimentation rate, CRP= C-reactive protein, IL6: Interleukina 6; TNF= Tumor Necrosis Factor; TNF-R: Receptor del TNF alfa; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, IL23= Interleukina 23, IL22= Interleukina 22; IL17: Interleukina 17; IL4= Interleukina 4.

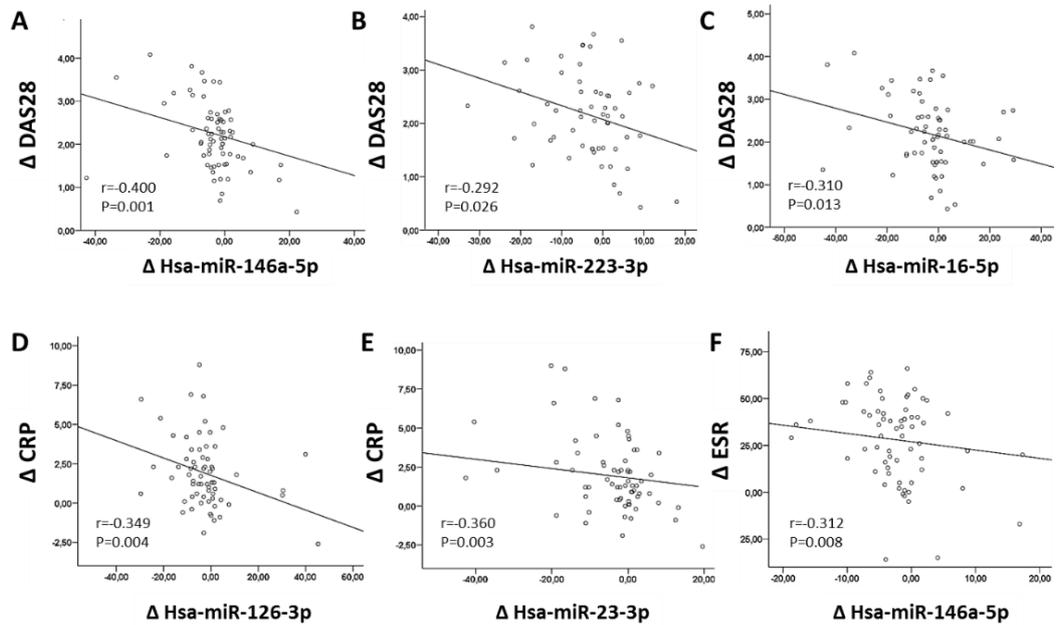


Figura 11. Correlaciones entre los cambios observados en los niveles séricos de miRNAs y los ocurridos en variables clínicas en pacientes AR. Los análisis de correlación se realizaron aplicando el test Spearman's rank correlation.

6. Los niveles séricos de los miRNAs hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-223-3p como predictores de respuesta a la terapia en pacientes con AR.

Como característica general, observamos que cuanto mejor era el estatus del paciente antes del tratamiento (en términos de actividad de la enfermedad y parámetros inflamatorios) menores fueron los cambios observados, tanto en el índice DAS28 como en los niveles de miRNAs promovidos por el tratamiento anti-TNF- α /DMARDs. Es más, niveles elevados de miRNAs en el estado basal fueron indicativos de no respuesta terapéutica (Figura 12A)

Dichos resultados se confirmaron en análisis de curvas ROC, los cuales mostraron que los niveles basales de los miRNAs hsa-miR-23-3p y hsa-miR-223-3p, con un valor de corte de 6.9 y 11.2 (expresión relativa) respectivamente, fueron predictores de no respuesta a la terapia combinada anti-TNF α /DMARDs (Figuras 12B-C) con una sensibilidad del 62.5% y 57.1%, y una especificidad de 86.4% y 90.2%, respectivamente.

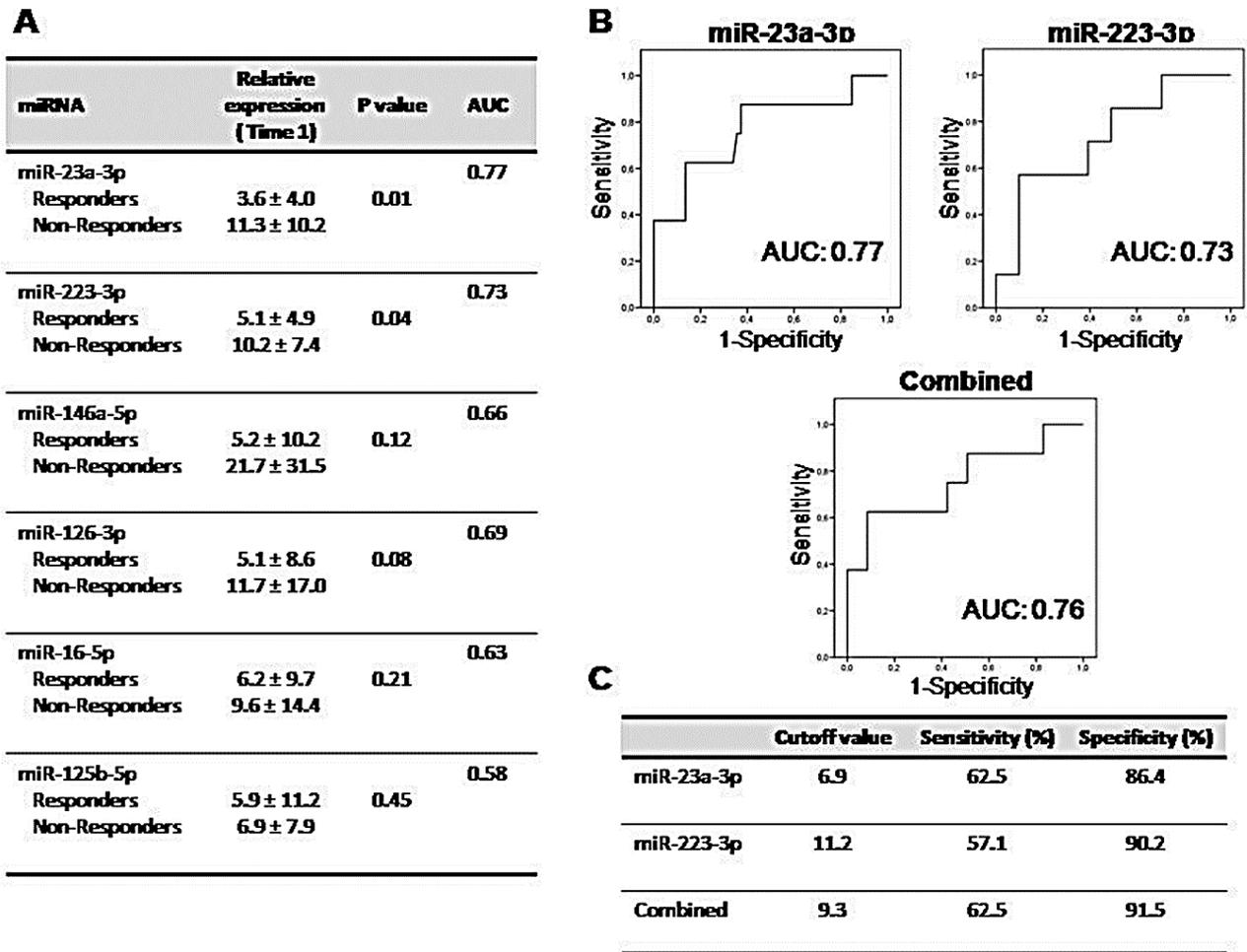


Figura 12. Identificación de miRNAs candidatos como predictores de respuesta a terapia. **A**, Expresión relativa de los miRNAs validados en el suero de los pacientes AR de forma previa a la terapia combinada anti-TNF- α /DMARDs (T1). Los resultados se expresan como media \pm desviación standard (DS). El área bajo la curva se calculó a partir de las curvas ROC. **B**, Curvas ROC para el miR-23a-3p (izquierda) y el miR-223-3p (derecha), los cuales mostraron, entre los 6 validados, los niveles de AUC más elevados; debajo se muestra el gráfico correspondiente al análisis realizado con la combinación de ambos miRNAs. **C**, Sensibilidad y especificidad de los análisis ROC para cada miRNA. El punto de corte seleccionado fue el correspondiente al mayor valor de especificidad.

El análisis de los cambios en la expresión relativa de dichos miRNAs después del tratamiento mostró una reducción en lugar de un aumento en los pacientes no respondedores, mientras que en los respondedores se produjo un incremento significativo en 3 de los miRNAs validados (Figura 13A).

Para evaluar su relevancia como biomarcadores de respuesta a la terapia combinada anti-TNF- α /DMARDs realizamos un análisis de curvas ROC de estos miRNAs. Dicho análisis demostró que las AUC (áreas bajo la curva, *area under curve*) más elevadas se obtuvieron con los cambios promovidos en miR-23 y miR-223. Los cambios en la expresión relativa del miR-23, con un punto de corte de 0.83, demostraron una sensibilidad del 62.5% y una

especificidad de 77.6%. En el punto de corte de 3.03 para el miR-223, los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron 57.1 % y 84.3 % respectivamente (Figura 13 A-C).

Para incrementar la precisión del análisis, realizamos un estudio de curvas ROC tomando como referencia los valores combinados de los miRNA miR-23 y miR-223. El ratio de la combinación de estos miRNAs al T1 demostró un aumento tanto en la sensibilidad (62.5%) como en la especificidad (91.5%) en relación con las obtenidas para cada uno de los miRNAs por separado (Figura 13B-C). Asimismo, la ratio de la combinación de los cambios operados en los niveles dichos miRNAs (T1-T2) también alcanzó el valor de AUC más alto (0.88) y un valor de corte óptimo de 1.5, siendo la sensibilidad y especificidad de 62.5% y 84.7 %, respectivamente (Figura 13 B-C).

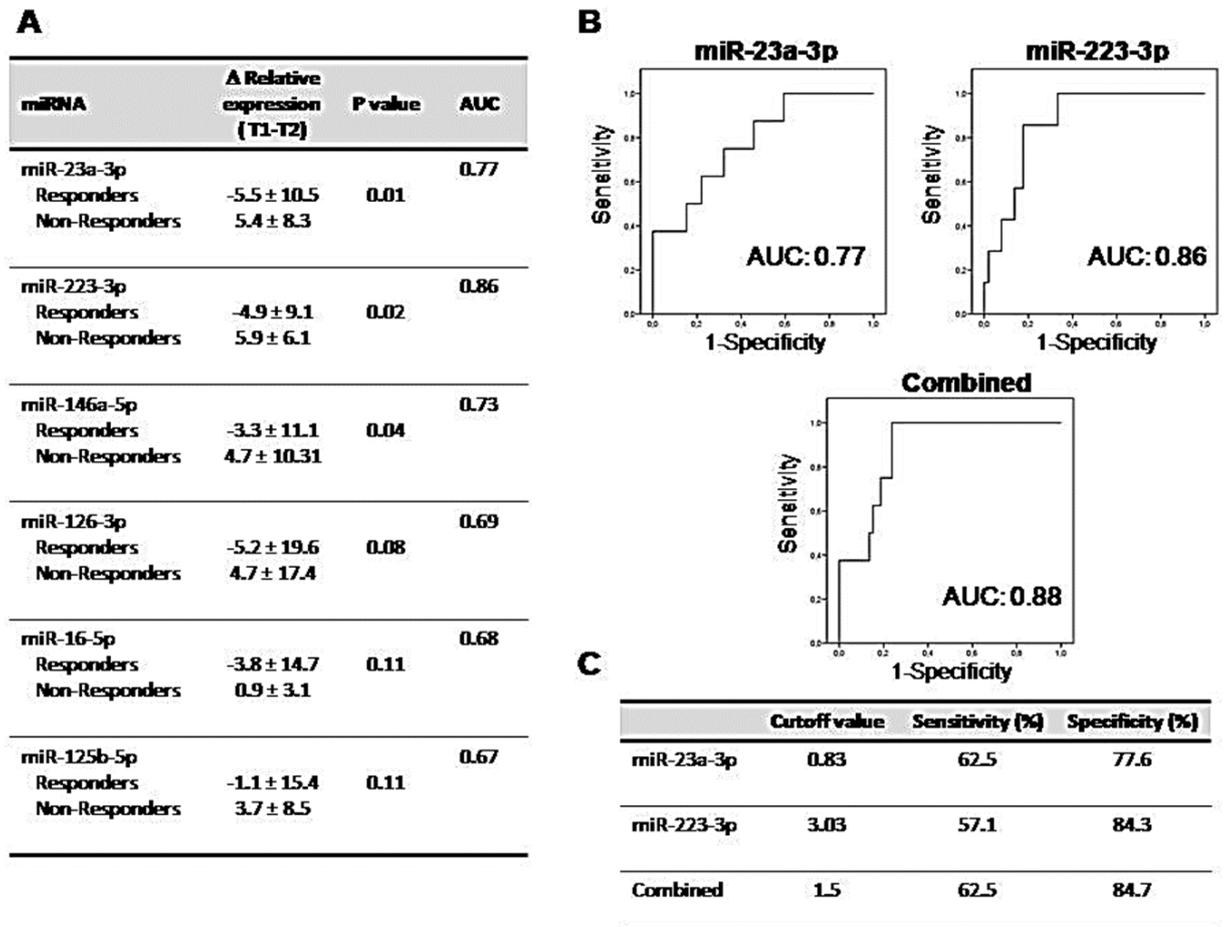


Figura 13. Identificación de miRNAs candidatos como biomarcadores de respuesta a terapia. **A**, Cambios en los niveles de expresión relativa de los 6 miRNAs validados en respuesta a la terapia combinada anti-TNF- α /DMARDs (T1-T2). Los resultados se expresan como media \pm desviación standard (DS). El área bajo la curva se calculó a partir de las curvas ROC. **B**, Curvas ROC para los cambios ocurridos en el miR-23a-3p (izquierda) y el miR-223-3p (derecha), los cuales mostraron, entre los 6 validados, los niveles de AUC más elevados; debajo se muestra el gráfico correspondiente al análisis realizado con la combinación de ambos miRNAs. **C**, Sensibilidad y especificidad de los análisis ROC para cada miRNA. El punto de corte seleccionado fue el correspondiente al mayor valor de especificidad.

En su conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que los niveles séricos de los miRNA hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-223-3p podrían actuar como predictores de respuesta a la terapia, e igualmente como biomarcadores de respuesta al tratamiento combinado con antiTNF- α /DMARDs con una alta especificidad.

Discusión

6. DISCUSIÓN

El amplio panel de fármacos biológicos disponibles para el tratamiento de la AR y la necesidad de un tratamiento efectivo que evite la destrucción articular y, por tanto, la discapacidad, hacen particularmente importante la búsqueda de marcadores de enfermedad que permitan la predicción de la respuesta al tratamiento en los pacientes con AR, para ayudar a los reumatólogos a seleccionar la terapia óptima para un paciente determinado, lo cuál hasta la fecha es aún una necesidad no cubierta. Teniendo en cuenta, además, que el balance riesgo/beneficio de cada tratamiento puede ser diferente en función de las características del paciente y de la enfermedad, que no están exentos de efectos secundarios y que estos fármacos suponen una proporción no despreciable del gasto farmacéutico, así como el hecho de que hasta un 30% de los pacientes podrían no responder adecuadamente a ellos, disponer de parámetros que permitan predecir la respuesta al tratamiento es de suma importancia para poder realizar una decisión terapéutica lo más precisa posible [190]. A la luz de los datos disponibles hasta la fecha, la determinación de parámetros clínicos aisladamente se ha mostrado insuficiente para predecir qué pacientes pueden responder mejor a la terapia. En algunos estudios, se han propuesto marcadores serológicos, como la presencia de antiCCP, el aumento de PCR o los niveles séricos de VGF, MCP-1, TNFR, así como perfiles genéticos para identificar pacientes con mayor probabilidad de respuesta al tratamiento [191,192,193].

Conservados a través de la evolución, los miRNAs son una clase de moléculas de ARN endógenos de cadena corta, no codificantes, que regulan la expresión de genes, de forma secuencia-específica a través de la unión con RNAm dianas para su degradación o represión translacional. Se sabe que están implicados en la patogénesis de la AR, tienen un papel crucial en el mantenimiento de la respuesta inmune e inflamatoria y que están involucrados en el desarrollo de las características fenóticas de la enfermedad, tanto de la hiperplasia sinovial como en la destrucción articular y que, incluso, podrían ejercer influencia sobre la actividad de la enfermedad en el contexto de la milla inflamatoria de la articulación reumatoide [194]. Este conocimiento de que existe una expresión alterada de los miRNAs en células inmunes

residentes involucradas en la patogénesis de la AR ha llevado a buscar su potencial valor como biomarcador molecular para diagnóstico, pero también es importante que pudieran ser marcadores de predicción de resultados de enfermedad, y de respuesta al tratamiento, lo cuál está bien documentado en cáncer, mientras que en AR permanece poco explorado. Las características peculiares de los miRNAs tales como su estabilidad en los fluidos corporales, su especificidad tisular y su fácil accesibilidad los hace biomarcadores ideales.

Como se ha comentado en la introducción, existen datos de que los miRNAs están presentes tanto en sangre como en líquido sinovial (LS) y en la sinovial inflamada y de que pueden tener un papel en el diagnóstico de la enfermedad. Murata y cols. encontraron que el patrón de expresión de miRNAs en LS parece distinto al del plasma. Encontraron que las concentraciones plasmática de miR-16, miR-132, miR-146a y miR-223 fueron menores que en LS que en plasma, los cuáles podrían proceder del tejido sinovial, mientras que los miRNAs detectados en plasma serían generados por varios tejidos, por lo que concluyeron que la detección de miRNAs en el suero de pacientes probablemente refleja más el estatus de activación sistémica que la afectación local articular, y sugiriendo que es la inflamación sistémica de la enfermedad la que marca el patrón de miRNAs circulantes en AR [195]. En este mismo trabajo encontraron que los niveles plasmáticos de miR132 eran diferentes en pacientes con AR y osteoartritis respecto a los controles sanos, pero no podía diferenciar ambas patologías y que las concentraciones de miR-16, miR-146a, miR-155 y miR-223 estaban aumentadas en LS de pacientes con AR respecto a los pacientes con osteoartritis (no en plasma), por lo que podrían usarse como un marcador que diferencie ambas enfermedades. Posteriormente estos mismos autores identificaron una firma de miRNAs en plasma como biomarcadores diagnósticos específicos para pacientes con AR, incluso antiCCP negativo, que incluyeron miR-125a-5p, miR-24, miR-30a-5p [196]. Más recientemente, se ha descrito un perfil de expresión de miRNAs que podrían identificar a pacientes con AR respecto a controles sanos, identificados en un Array que incluyó 1800 miRNAs, en el que se encontró que la expresión aumentada de miR-4634, miR-181d, miR-4765-5p, miR-122-3p, miR-9-5p y miR-219-23p, aunque dado el gran número de miRNAs incluidos en el Array algunos de los miRNAs encontrados no se habían documentado aún como implicados en AR[197].

Hasta la fecha hay pocos datos sobre si los cambios en la expresión de los miRNAs pueden constituir marcadores de predicción de respuesta a tratamiento en pacientes con AR. En base a dichas premisas, realizamos el presente trabajo, con el fin de determinar si los cambios operados en la expresión de determinados miRNAs en pacientes con AR activa podría ser útil para identificar a los pacientes que tendrán mayor probabilidad de responder al tratamiento con antiTNF- α . Las modificaciones observadas en los niveles séricos de miRNAs en pacientes con AR antes y después de la terapia combinada con antiTNF- α y DMARDs, y su estrecha relación con la mejoría de la enfermedad, sugieren su uso potencial como nuevos biomarcadores para monitorizar la respuesta al tratamiento.

En nuestra cohorte, un alto porcentaje de pacientes mostraron respuesta clínica completa a la terapia combinada TNF- α /DMARDs, no sólo en cuanto a parámetros clínicos de actividad de la enfermedad (recuento de articulaciones inflamadas, escalas de dolor, DAS28, etc), sino también en cuanto a la función física y la calidad de vida (HAQ). Estos resultados han sido validados en estudios previos, siendo la media de remisión entre pacientes tratados con antiTNF α con o sin MTX variable de acuerdo con el tratamiento y oscila entre 21 y 46% [198,199]. Nuestro estudio está realizado en condiciones de práctica clínica habitual y en pacientes con formas evolucionadas de establecida, con actividad alta de su enfermedad a pesar de tratamiento con DMARDs. Hemos encontrado un número alto de respondedores a la terapia con antiTNFalfa (un 89.5%) en relación con los datos publicados, lo cuál se explica porque la respuesta se ha medido siguiendo los criterios de mejoría de la definición EULAR basados en el DAS28 en lugar de los criterios ACR, que son los que habitualmente se valoran en los ensayos clínicos. Los criterios ACR son más restrictivos porque tienen en cuenta el número de articulaciones dolorosas e inflamadas, la valoración global y del dolor por el paciente y la valoración del médico, así como los parámetros de laboratorio (VSG o PCR). Por el contrario el índice DAS28 incluye los recuentos articulares, la valoración global del paciente y la VSG ó PCR. La definición de EULAR tiene en cuenta tanto el grado de mejoría como la situación actual del paciente, y ha mostrado una validez comparable a los criterios de respuesta del ACR en los ensayos clínicos de pacientes con AR. Los criterios ACR, además, tiene una valoración dicotómica (si/no) y la definición de respuesta es más estricta, mientras que la valoración mediante DAS28 es un valor numérico lo que lo hace, junto con el menor

número de ítems que evalúa, más útil en práctica clínica habitual, como es el caso de nuestro trabajo [200]. Además, y dado que uno de los objetivos de nuestro trabajo fue establecer un patrón de miRNAs que pudiera discriminar bien aquellos pacientes que no responden y poder darle valor como bioimarcador de respuesta, consideramos dentro del grupo de pacientes respondedores a la terapia a los pacientes que alcanzaron una respuesta, según criterios EULAR, buena, pero también a los que obtuvieron una respuesta moderada, tal y como se explica en el apartado de Materia y Métodos, con el objetivo de que el análisis ROC diferenciase muy claramente a los pacientes que no presentaban ninguna respuesta, lo cuál puede explicar el porcentaje alto de respondedores.

La respuesta clínica a la terapia en nuestros pacientes también se ha demostrado en términos de parámetros de laboratorio. Así, los parámetros serológicos como la VSG, PCR y el FR también mostraron una reducción a los 6 meses de tratamiento en nuestra cohorte global de pacientes, aunque de forma significativa y más dramática en los pacientes que respondieron al tratamiento, sin discrepancias en base a la administración de diferentes tipos de bloqueadores del TNF α . El FR se redujo de forma significativa tanto en pacientes respondedores como en los no respondedores, evidenciando que está más implicado en el desarrollo de la enfermedad que en el grado de actividad. Asimismo, los niveles de IL-6, IL-17, y TNF- α se redujeron de forma significativa en a los 6 meses de tratamiento en los pacientes respondedores respecto a los pacientes no respondedores. El resto de citoquinas inflamatorias como la IL-23, IL-22 e IL-4 presentaron una tendencia a la reducción, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. No encontramos cambio en los niveles de de TNFR1I, MCP1 y VEGF.

En relación al perfil de miRNAs circulantes, analizados mediante PCR array, la mayoría de ellos (90.1%) aumentaron en respuesta a la terapia anti-TNF- α a los 6 meses de tratamiento. Dado que los miRNAs actúan generalmente como reguladores negativos de sus proteínas diana, el incremento en los niveles de miRNAs podría implicar una reducción en la expresión de las proteínas diana, alteradas en pacientes con AR antes de la terapia biológica. En este sentido, la clasificación funcional de los miRNAs, mediante el análisis IPA, nos permitió demostrar que la mayoría de los miRNAs alterados tenían como potenciales dianas

moléculas, proteínas y factores de transcripción involucrados en procesos de inflamación y autoinmunidad, activación de células B y T, disfunción musculoesquelética o enfermedad cardiovascular.

Asimismo, el incremento en los niveles de estos miRNAs después del tratamiento combinado con antiTNF- α /DMARDs podría estar asociado con una reducción en el perfil inflamatorio y la mejoría del status global de la enfermedad en estos pacientes. Como soporte de esta hipótesis, posteriormente encontramos una reducción significativa de los niveles séricos de marcadores inflamatorios y de autoinmunidad.

Diversos trabajos han analizado el valor del perfil de citoquinas como posibles factores predictores de respuesta al tratamiento en pacientes con AR, aunque no existen datos concluyentes. En el caso de los anti-TNF- α , Potter y cols., describieron la asociación entre la positividad del factor reumatoide y la peor respuesta al tratamiento [201]. Braun et al describieron el mismo fenómeno asociado a los anticuerpos anti-CCP [202]. Entre las diversas citoquinas involucradas en la patogenia de la AR se ha intentado hallar alguna que pudiera servir como factor predictor de respuesta a un tratamiento concreto. Wright y cols., analizaron el perfil de 12 citoquinas en LS y plasma en respuesta a tratamiento antiTNF- α en 42 pacientes con AR. Encontraron que los pacientes que no respondieron a la terapia presentaban basalmente niveles elevados de IL-6 en LS y niveles bajos de G-CSF e IL-2, mientras que el resto de citoquinas evaluadas en LS, incluyendo IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , GM-CSF y TNF α no fueron predictoras de respuesta, sugiriendo que estas citoquinas podrían ser útiles para predecir respuesta. Sin embargo, en plasma no encontraron valores significativamente diferentes entre los pacientes que respondieron o no al tratamiento, aunque los niveles de IL-6 se redujeron postratamiento. En este mismo trabajo se puso de manifiesto que existen diferencias en los niveles de citoquinas circulantes comparados con las encontradas en áreas de inflamación en base a la observación de que los niveles de citoquinas eran más bajos en plasma que en LS [203]. Nosotros encontramos unos niveles basalmente más bajos en suero en el grupo de pacientes respondedores respecto a los no respondedores en los niveles de FR, IL-6, IL-23, IL-22, IL-4 y de MCP1 y VEGF, pero no para los niveles de IL-17, que se encontraban más altos.

En un estudio similar, se demostró que la respuesta al tratamiento con antiTN-F α , en concreto con Etanercept, se asoció con niveles post-tratamiento reducidos de IL-6 y aumentados de IL-23 e IL-32, mientras que no se encontró cambio en los niveles estas ILs entre los pacientes no respondedores respecto a los valores basales ni tampoco se encontraron niveles basales que pudieran ser predictivos de respuesta [204].

De forma similar a nuestros resultados, otro estudio realizado con pacientes tratados con Rituximab (fármaco que depleciona linfocitos B), encontró un descenso significativo de los niveles séricos de IL-6 en los pacientes respondedores; sin embargo, los pacientes que no respondieron presentaban concentraciones basales más elevadas [205]. Un trabajo más reciente, en el que se realizó un array multiple en pacientes con AR de larga evolución para establecer un perfil de citoquinas que, evaluadas antes del inicio del tratamiento, pudieran ser predictoras de remisión para Tocilizumab (anticuerpo monoclonal que bloquea al receptor de la la IL-6) y Etanercept, encontraron que el cambio producido en el perfil de citoquinas fue diferente para ambos fármacos, probablemente debido a su diferente mecanismo de acción. Los resultados mostraron que, en respuesta a Tocilizumab, los niveles séricos basales de IL-6, IL-8, RTNFI y II y VEGF fueron predictivos de remisión a la semana 16 y, en respuesta a Etanercept, aunque la asociación fue más débil, la remisión se asoció a la presencia de niveles más elevados de forma basal de IL-9, TNF α y VEGF1 [206]. Por tanto, en base a estos datos, parece que la magnitud del cambio en los niveles circulantes de citoquinas reflejan la respuesta clínica promovida por el tratamiento en los pacientes, de manera que, como se demuestra en nuestro trabajo, la reducción de los niveles de algunas de ellas, como la IL-6 y la IL17, es más significativa en los pacientes respondedores respecto a los que no responden.

La degradación proteolítica de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) en el cartílago articular es un evento catabólico crucial en la articulación en la AR [207,208]. Los macrófagos sinoviales y los sinoviocitos producen mediadores inflamatorios incluyendo prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y citoquinas proinflamatorias (tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α) que estimulan a los condrocitos articulares para producir enzimas degradativas de la matriz tales como metaloproteinasas de la matriz,

lo que conduce a una destrucción y degeneración del cartílago de la MEC [209]. Por tanto, un supuesto efecto en la reducción de la maduración del condrocito (como se indentifica en el aumento observado en los cluster de miRNAS después de la terapia), podríantener efectos beneficiosos en la prevención del daño articular en los pacientes con AR.

Los miRNAs validados por RT-PCR en nuestra cohorte de pacientes, de entre aquellos que habían aumentado de forma significativa su valor en el array y que estaban asociadas con la patogenia de la AR (miR146a-5p, miR-16-5p, miR-23-3p, miR-125b-5p, miR223-3p; miR126-3p), han sido previamente descritos como reguladores relevantes del desarrollo de las células inmunes. Se sabe asimismo que juegan un papel crucial en la respuesta inflamatoria y actúan como moléculas clave en la patogénes de varias enfermedades crónicas y autoinmunes, incluyendo la AR [210,211]. En este sentido, diversos trabajos recientes han encontrado alteraciones basales en la expresión de estos miRNAs. Así, tres ensayos clínicos publicados en 2008 indicaron la existencia de una expresión alterada de algunos de estos miRNAs (hsa-miR-16-3p, hsa-miR-132, hsa-miR-146a-5p y hsa-miR-155-3p) en leucocitos de pacientes con AR [212].

En un estudio publicado en 2014, se encontró que el miR-125b estaba sobreexpresado en suero en pacientes con AR y otras artritis inflamatorias comparado con controles sanos o pacientes con Osteoartritis, por lo que potencialmente puede ser considerado un marcador de AR [213].

La expresión de miR-146a puede ser inducido por numerosas partículas microbianas o citoquinas. Igualmente, diferentes genes en una gran variedad de tipos celulares son conocidas dianas de este miRNA, necesario para la función supresora de los linfocitos T reguladores (Treg) y la inhibición de la respuesta Th1 [213]. Así, un estudio reciente encontró que la expresión disminuida de hsa-miR-146a y hsa-miR-155-3p contribuye a un fenotipo de los linfocitos Treg anormal en pacientes con AR [214]. Además, existe una disminución en sus niveles circulantes en AR de reciente inicio comparado con AR establecida y controles sanos [215], por lo que podría ser útil en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Sin embargo, por otra parte, la concentración de miR-146 también se ha visto que se correlacionan positivamente con el TNF- α tanto en sangre como en LS (contribuyendo a la

inducción y mantenimiento de la respuesta inflamatoria) [165], aunque se ha demostrado que sus principales 2 dianas, el TRAF-6 (factor asociado al receptor del TNF, del inglés *TNF receptor-associated factor*) y el IRAK-1 (kinasa asociada al receptor de la IL-1, del inglés *IL-1 receptor-associated kinase*), no se modifican en contraste con el TNF α , por lo que se piensa que, o bien podrían no actuar como reguladores negativos de la inflamación en AR sino como agentes inflamatorios mediante la inducción del TNF α [165,216] o bien que sería incapaz de regular sus dianas, provocando un mantenimiento prolongado del aumento de TNF- α [216].

MiR-223-3p se describió como un modulador de la diferenciación de la línea hematopoyética. Actualmente está emergiendo como implicado en enfermedades inflamatorias y metabólicas, con un papel fundamental en las enfermedades musculares, la diabetes y la aterosclerosis y en lupus [217], así como se ha visto que se asocia particularmente con el desarrollo de AR. Murata y cols, observaron que la expresión de miR-223 era más baja en plasma de pacientes con AR activos [187], y, más recientemente, Filková y cols lo describieron como un marcador de actividad de enfermedad y de predicción de resultado de tratamiento en pacientes con AR naive de inicio precoz [215]. Asimismo, se expresa en macrófagos, monocitos y linfocitos en el pannus reumatoide en relación con la activación de osteoclastos responsables de la destrucción articular [218].

Los miR-16 y miR-146 presentan correlación con el estado de actividad de la AR [216]. EL miR-16, además, se expresa a concentraciones más bajas en pacientes con AR de inicio respecto a las formas más evolucionadas y respecto a los controles sanos, con lo que podría ser considerado marcador de enfermedad [215].

El miR-23 es un miRNA anti-inflamatorio que se encuentra reducido en AR siendo potencialmente suprimido por la IL-17 [219], y está implicado en la regulación de la apoptosis inducida por TNF- α en células madre mesenquimales y en la diferenciación de los osteoblastos [220].

Muy recientemente se ha descrito que miR-126 está involucrado en alteraciones en la metilación del ADN en pacientes con AR [221], aunque datos previos habían puesto de

manifiesto su relación con la inflamación vascular y su papel como biomarcador en lupus, ictus isquémico y enfermedad coronaria y arteriosclerosis [222,223].

Es interesante destacar que en el presente estudio hemos encontrado que varios genes son dianas de más de uno de los miRNAs verificados (Tabla 4). Por ejemplo, el gen que codifica para la proteína CHUK puede ser potencialmente regulado por 4 de los 6 miRNAs validados. CHUK [*conserved hélix-loop-helix ubiquitous kinase*, ó subunidad alfa de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa-B (IKK- α), o IKK1] es una proteína quinasa que inhibe la fosforilación de la quinasa I κ B, un complejo enzimático involucrado en la activación de la respuesta celular a la inflamación a través de la activación del factor de transcripción NF κ B, principal regulador de la respuesta inflamatoria en AR [224]. Casi todos los factores proinflamatorios involucrados en la patogénesis y progresión de la AR (por ejemplo, IL-6 o TNF- α) están regulados por la transcripción del factor NF κ B. Por tanto, fármacos que modulen la activación y función de CHUK podrían tener un valor terapéutico en enfermedades inflamatorias como la AR.

Otros genes directamente relacionados con la AR también resultaron ser dianas múltiples para estos miRNAs, incluyendo las cadenas α y β de receptor de la IL6 (IL6R e IL6ST, *IL6 receptor alpha (IL6R) and beta (IL6ST) chains*), el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF2, *fibroblast growth factor 2*), numerosas moléculas intracelulares (i.e. PI3K δ), y el receptor tipo II de la proteína morfogenética del hueso (BMP2, *bone morphogenic protein receptor type II*).

Estudios recientes han demostrado que, además de su papel en la estimulación de la producción de anticuerpos, la IL-6 promueve la inflamación del tejido sinovial y la osteoclastogénesis, conduciendo a la sinovitis severa con formación de pannus y a la destrucción progresiva del cartílago articular y la destrucción ósea en múltiples articulaciones que se produce en la AR [225]. Además, la IL-6 contribuye de forma importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular en pacientes con AR [226]. En nuestra cohorte, encontramos que los receptores α y β de la IL-6 eran posibles dianas para 3 de los 6 miRNAs validados (hsa-miR-23-3p, hsa-miR-125b-5p, y hsa-miR223-3p). En paralelo, el análisis del plasma mostró que los fármacos antiTNF- α promueven una reducción significativa de los

niveles de la IL-6, lo que sugiere un papel para estos miRNAs en la regulación de la producción de IL-6.

Una segunda diana para los tres miRNAs validados que encontramos alterada en pacientes con AR después del tratamiento con TNF- α /DMARDs fue FGF-2. Se sabe que, en el líquido sinovial, FGF-2 interviene en el paso final de la vía de resorción osteoclástica durante la destrucción articular en la AR, la cual es precedida por el reclutamiento y diferenciación de los osteoclastos. Por tanto, el FGF2 endógeno podría participar en la patogénesis de que la enfermedad resortiva ósea, a través de su acción directa en los osteoclastos [227].

Desde el punto de vista molecular, la severidad y el pronóstico de la AR depende del balance entre vías inflamatorias o destructivas y vías homeostáticas o reparativas [228]. Así, la subunidad delta de la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K δ , *phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta*) podría constituir una diana terapéutica prometedora en la AR. PI3K δ se expresa de forma importante en la sinovial de la AR, especialmente en el revestimiento sinovial. Su expresión es selectivamente inducida por las citoquinas inflamatoria TNF- α y IL-1. Se ha demostrado que PI3K δ es un importante regulador del crecimiento de los fibroblastos mediado por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) y de su supervivencia vía Akt/PKB (vía de señalización de la protein quinasa B o PKB, que favorece la supervivencia y crecimiento celular) [229]. Por tanto, el bloqueo de PI3K δ en la AR podría modular la función de los sinoviocitos mediante mecanismos anti-inflamatorios y otros procesos moduladores de enfermedad. Es más, la familia de las PI3K juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, modulando varios procesos biológicos esenciales, tales como el metabolismo, la homeostasis vascular y trombogénesis [230]. De hecho, existen algunos datos que indican que la inhibición farmacológica del PI3Ks puede ser una nueva estrategia terapéutica para prevenir complicaciones cardiovasculares en enfermedades autoinmunes.

Por otra parte, numerosas evidencias sugieren que la señalización a través de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, *bone morphogenic protein*) podría tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la articulación y su patología. La señalización a través de las BMP, inducida a través de la unión de un ligando BMP dimérico a

los receptores BMPR tipo I y II, tiene un papel clave en la patogénesis de la AR [231]. Es más, se ha demostrado que la expresión de las BMP puede ser regulada por acción de fármacos antiTNF- α [232], reafirmando así el papel relevante de los miRNAs, modificados en nuestra cohorte AR en respuesta al tratamiento, que tienen a esta proteína como diana.

De entre los miRNAs analizados en el array, la expresión de 6 miRNAs mostró un aumento significativo en respuesta al tratamiento con antiTNF- α a los 6 meses: miR146a-5p, miR-16-5p, miR-23-3p, miR-125b-5p, miR223-3p, miR126-3p. Otros 4 miRNAs, miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-16-5p y miR-155p mostraron una clara tendencia al incremento en respuesta a la terapia, pero su cambio no alcanzó significación estadística en el análisis. Filkova y cols., han estudiado la asociación de la expresión alterada en suero de un perfil seleccionado de miRNAs, (miR-146a, miR-155, miR-223, miR-16, miR-203, miR-132 y miR-124a) en pacientes con AR como marcadores de diagnóstico de enfermedad precoz, actividad clínica y respuesta a tratamiento [215]. En nuestro estudio se llevó cabo un Array que incluía 84 miRNAs previamente descritos como alterados en su expresión en plasma en diversas condiciones patológicas. En consonancia con nuestros resultados, dicho estudio demostró la asociación de dos de los miRNAs encontrados significativamente aumentados en respuesta a la terapia combinada TNF- α /DMARDs en nuestro estudio (hsa-miR-223-3p, y hsa-miR-16-5p) con la actividad de la enfermedad, pero sólo en aquellos pacientes que tenían una corta evolución de la enfermedad, y no en los pacientes con AR establecida. A diferencia de nuestra cohorte, en este estudio se incluyeron pacientes con enfermedad más precoz (de menos de 8 meses de evolución) y, además, no todos los pacientes recibieron tratamiento combinado. También encontraron que, a los 3 meses tras el tratamiento con DMARDs en pacientes con AR de reciente inicio, se produjo un aumento en la expresión de miR-16 y miR-223, así como que las concentraciones basales más altas se asociaron con una mayor respuesta, medida por descenso del DAS28 a los 3 y a los 12 meses. No encontraron correlación con parámetros analíticos como PCR o VSG para miR-16; sin embargo, los niveles de miR-223 sí se asociaron significativamente tanto con mejoría clínica, medida por DAS28, como por parámetros analíticos (PCR), sugiriendo que estos miRNAs pueden usarse como marcador de actividad en pacientes con AR de corta evolución de la enfermedad y que su monitorización puede ser

útil como biomarcadores de respuesta a tratamiento, ayudando a identificar pacientes que pacientes deberían ser tratados con DMARDs y/o antiTNF- α de forma más precoz.

En nuestra cohorte se realizó un estudio de correlación en el que se demostró, en primer lugar, la existencia de una relación significativa entre todos los miRNAs validados, lo que apoya la idea de que los miRNAs están interrelacionados, pudiendo interactuar unos sobre otros para regular sus genes diana, reafirmando la hipótesis conocida de que los miRNAs pueden actuar en forma individual o en clusters, así como que los miRNAs agrupados podrían ser más eficientes en la regulación de procesos complejos [233]. Además, todos los miRNAs validados tienen posibles dianas directamente asociadas a la patogenia de la AR e involucrados en la respuesta a los fármacos antiTNF- α .

De igual modo, observamos un aumento en la concentración de los miRNAs validados a los 6 meses del tratamiento con terapia combinada antiTNF- α /DMARDs, y encontramos una correlación negativa en los niveles de los miRNAs validados y los cambios ocurridos en varios parámetros clínicos e inflamatorios, apoyando la idea de que los miRNAs pueden ser biomarcadores de respuesta al tratamiento. En un estudio similar, realizado por Duroux-Richard y cols. [234], en respuesta a tratamiento con Rituximab, se encontró que la concentración de uno de los miRNAs validados en nuestro estudio, el miRNA-125b, no se correlacionaba con la actividad de la enfermedad, pero sí predecía una mejor respuesta a tratamiento con Rituximab cuando los niveles de dicho miRNA se encontraban elevados basalmente y cuanto mayor era la diferencia entre los niveles medidos a los 3 meses.

El análisis del valor predictivo de la magnitud del cambio de la expresión de los miRNAs validados en la respuesta al tratamiento demostró que, cuanto peor era la actividad basal antes de iniciar el tratamiento, mayor cambio se produjo en la respuesta de los miRNAs a la terapia y, que, a diferencia de los estudios anteriores, niveles más altos de miRNAs en el momento basal se asociaban con peor respuesta. Además, encontramos, que el nivel de expresión basal de los miRNAs podría ser predictivo de respuesta al tratamiento (hsa-miR-23-3p y hsa-miR-223-3p) pueden actuar: 1) como predictores de respuesta a tratamiento con antiTNF α /DMARDs (indicando qué pacientes podrían o no beneficiarse del mismo); 2)

como biomarcadores de respuesta al tratamiento (de modo que sus niveles plasmáticos tras 6 meses de terapia podrían ser indicativos del grado de respuesta) en pacientes con AR.

En un estudio publicado muy recientemente, realizado en pacientes con AR muy precoz y en el que estudiaron la expresión de 377 miRNAs en sangre total, en respuesta al tratamiento con ADA frente a placebo [235]. Dicho estudio ha demostrado la existencia de una expresión diferencial de miRNAs celulares de pacientes AR en respuesta a ADA con respecto a los pacientes que se trataron con placebo. Este trabajo complementa los resultados obtenidos en nuestro estudio, realizado en suero, ya que demuestra cambios en la expresión de miRNAs a nivel celular, que se sabe que puede ser diferente a la expresión en suero. Los pacientes que respondieron a la terapia presentaban, antes del tratamiento, una expresión reducida basal de miR-22, miR-23a, miR-152, miR-28-3p, miR-185, miR-221 y miR-886-3p y expresión aumentada para miR-590-5p y miR-660. Sólo los niveles basales reducidos de miR-22 correlacionaban con respuesta al tratamiento con ADA. Asimismo, los pacientes que obtuvieron buena respuesta al tratamiento presentaron un aumento en los niveles de expresión de miR-22 en sangre total, respecto a los que no alcanzaron respuesta o la respuesta fue moderada.

Nuestros datos contrastan con los encontrados en otro estudio realizado en pacientes con Artritis Psoriásica en respuesta a tratamiento con antiTNF- α etanercept [236]. En esta cohorte de pacientes, el tratamiento con ETA disminuyó significativamente los niveles séricos de hsa-miR-223-3p y hsa-miR-126-5p, entre otros, a diferencia de lo ocurrido en nuestra cohorte. En adición, estos miRNAs no se relacionaron con la severidad de la enfermedad en los pacientes con Artritis psoriasisica. Estos datos sugieren una funcionalidad distintiva de miRNAs similares en las vías afectadas por la terapia combinada antiTNF- α /DMARDs dependiendo de la enfermedad inflamatoria considerada, en base al perfil inflamatorio predominante en cada una de ellas. Es más, en el marco de una misma enfermedad, se sabe que las citoquinas inflamatorias y otras proteínas asociadas a la patogénesis de la AR, así como los miRNAs que las regulan podrían predominar de forma diferente según el estadio de la enfermedad (precoz, agudo o crónico), dado que es que sus dianas predominantes pueden ser diferentes [237].

Dado que en el presente estudio no hemos llevado a cabo un array completo de miRNAs que integre todos los identificados hasta el momento (alrededor de 2500), no podemos excluir la existencia de un efecto complementario de otros miRNAs circulantes en la respuesta al tratamiento. Asimismo, debido a la heterogenicidad clínica de los pacientes con AR, nuestros datos deben ser confirmados en nuevas cohortes que incluyan un mayor número de pacientes. Igualmente sería aconsejable el desarrollo de nuevos estudios que evalúen los mecanismos subyacentes a la expresión alterada de estos miRNAs en respuesta a la terapia combinada antiTNF α /DMARDs, así como la identificación del origen celular de dichos miRNAs circulantes.

Nuestro estudio es el primer estudio publicado que establece un perfil de miRNAs y un valor de corte de cambio de su expresión en respuesta al tratamiento con antiTNF- α , que podría ser tomado como referencia para predecir respuesta al tratamiento. La fortaleza de nuestro estudio es que es un estudio prospectivo, en un grupo de pacientes tratados en condiciones de práctica clínica habitual y que el análisis presentado está basado en características clínicas basales, información fácilmente disponible para el clínico en el momento de la toma de decisión terapéutica. Las limitaciones de nuestro estudio son la ausencia de grupo control para contrastar los cambios encontrados en los pacientes y, por otro lado, la distribución heterogénea en el número de pacientes por terapia, que no permite establecer si pueden existir diferencias entre los distintos agentes inhibidores del TNF- α .

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

1. El tratamiento combinado antiTNF- α /DMARDs produce una respuesta clínica óptima en un alto número de pacientes con AR relacionada con una reducción significativa de marcadores inflamatorios en suero.

2. A su vez, dicho tratamiento promueve un incremento en la expresión de miRNAs circulantes específicos, directamente asociados a una reducción en la expresión de sus proteínas diana, alteradas en pacientes con AR antes de la terapia biológica, e implicadas en procesos de inflamación, autoinmunidad, disfunción musculoesquelética y enfermedad cardiovascular.

3. Los tres tipos de fármacos antiTNF α administrados produjeron idénticas tasas de respuesta o remisión, así como de cambios en los niveles de miRNAs circulantes, por lo que todos ellos pueden considerarse igualmente efectivos tanto en términos de eficacia clínica como de respuesta a nivel de marcadores serológicos.

5. Hemos desarrollado un modelo que identifica una firma de miRNAs circulantes específica, que puede ser útil como herramienta de ayuda en la práctica clínica para identificar a los pacientes que podrían no beneficiarse del tratamiento con antiTNF- α /DMARDs. Dichos miRNAs podrían igualmente actuar como biomarcadores de respuesta, de modo que sus niveles podrían ser indicativos de eficacia terapéutica y también del grado de respuesta al tratamiento.

En suma, las modificaciones observadas en los niveles séricos de miRNAs en pacientes con AR antes y después de la terapia combinada con antiTNF- α /DMARDs, y su estrecha relación con la mejoría de la enfermedad, sugieren su uso potencial como nuevos biomarcadores para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Artritis Reumatoide

1. García de Vicuña R, Ortiz A. Artritis Reumatoide (I). Etiopatogenia. *Medicine*. 2005; 9(28): 1805-14.
2. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García H, Ballina J, Gabriel R, Laffón A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)*. 2002; 42(1):88-95.
3. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid Arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24:733-45.
4. Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, Valentín E, Tañi C, Alunno A. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015; 33: 551-558.
5. Van Vollenhoven, R. F. Rheumatoid arthritis in 2012: Progress in RA genetics, pathology and therapy. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9, 70-72.
6. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A, Kochi Y. Genetic studies of rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 2015; 91(8): 410-22.
7. Suzuki A, Yamamoto K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2015; 33 (suppl 92): S40-S43.
8. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365:2205-19.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):30-37.
10. Hecberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weimblatt ME, Weisman MH. *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia. 2009.
11. Huizinga TW. Genetics in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4(3):195-200.
12. Bax, M, Heemst, JV, Huizinga, TWJ, Toes, REM. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011; 63, 459-466.
13. Wordsworth BP, Bell JI. The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1992; 14(1):59-78.

-
14. Matthey DL, Thomson W, Ollier WE, Batley M, Davies PG, Gough AK, Devlin J, Prouse P, James DW, Williams PL, Dixey J, Winfield J, Cox NL, Koduri G, Young A. Association of DRB1 shared epitope genotypes with early mortality in rheumatoid arthritis: results of eighteen years of follow-up from the early rheumatoid arthritis study. *Arthritis Rheum.* 2007. 56(5): 1408-16.
 15. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205-1213.
 16. Bennett SR, Falta MT, Bill J, Kotzin BL. Antigen-specific T cells in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5(4):255-263.
 17. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK, de Bakker PI. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature Genetics.* 2012; 44, 291-296.
 18. Ding B, Padyukov L, Lundström E, Seielstad M, Plenge RM, Oksenberg JR, Gregersen PK, Alfredsson L, Klareskog L. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 2009;60, 30-38.
 19. Rego-Pérez J, Fernandez-Moreno M, Carreira-García V, Blanco FJ. Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. *Reumatología clínica.* 2009; 5:268-279.
 20. De Alameda DE, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P, Holoschitz I. Immune dysregulation by the rheumatoid arthriis shared epitope. *J Immunol.* 2010; 185; 1927-34.
 21. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zhernakova A, Hinks A, Guiducci C, Chen R, Alfredsson L, Amos CI, Ardlie KG; BIRAC Consortium, Barton A, Bowes J, Brouwer E, Burt NP, Catanese JJ, Coblyn J, Coenen MJ, Costenbader KH, Criswell LA, Crusius JB, Cui J, de Bakker PI, De Jager PL, Ding B, Emery P, Flynn E, Harrison P, Hocking LJ, Huizinga TW, Kastner DL, Ke X, Lee AT, Liu X, Martin P, Morgan AW, Padyukov L, Posthumus MD, Radstake TR, Reid DM, Seielstad M, Seldin MF, Shadick NA, Steer S, Tak PP, Thomson W, van der Helm-van Mil AH, van der Horst-

-
- Bruinsma IE, van der Schoot CE, van Riel PL, Weinblatt ME, Wilson AG, Wolbink GJ, Wordsworth BP; YEAR Consortium, Wijmenga C, Karlson EW, Toes RE, de Vries N, Begovich AB, Worthington J, Siminovitch KA, Gregersen PK, Klareskog L, Plenge RM. *Nat. Genet.* 2010; 42, 508–514.
22. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K.. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2003; 34, 395–402.
23. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine.* 2007; 357; 357: 977-86.
24. Plenge RM¹, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357, 1199–1209.
25. Jawaheer D, Gregerson PK. Rheumatoid arthritis. The genetic components. *Rheum Dis Clin North Am.* 2002; 28: 1-15.
26. Suzuki A, Yamamoto K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology.* 2015; 33 (suppl 92): S40-S43.
27. Saad MN, Mabrouk MS, Eldeib AM, Shaker OG Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Advanced Research.* 2016; 7(1):1–16.
28. Stahl E, Raychaudhuri S, Plenge R. Polygenic inheritance of rheumatoid arthritis (RA) risk, California, Stanford University, Pharmacogenomics Research Network (PGRN), Research in Progress Seminars (RIPS); 2011. p. 66.

-
29. Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tabaco y otros factores ambientales en la artritis Reumatoide. *Reumatología clínica*. 2012; 8(6):342-350.
 30. 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.
 31. Wegner N, Wait R, Sroka A et al. Peptydilarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinate human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 2666-72.
 32. Pablos JL. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide. En: Manual SER de las enfermedades reumáticas. 6ª Edición. Elsevier España SL, 2015; 217-222.
 33. Blüm S, Redlich K, Smolen JS. *Semin Immunopathol*. 2014; 36: 531-540.
 34. Turner JD, Filer A. The role of sinovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Curr Op Rheumatol*. 2015; 27: 175-82.
 35. Takemura S, Braun A, Crowson C et al. Lymphoid neoangiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001; 167: 1072-1080.
 36. Astry, B, Harberts, E, Moudgil, KD. A Cytokine-Centric View of the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31, 927-940.
 37. Sánchez-Ramón, S. López-Longo, F. J.; Carreño, L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citoquinas proinflamatorias. *Reumatol Clin*. 2011;6(S3), S20– S24.
 38. Arboleya, L; Castañeda S. Osteoimmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatol Clin*. 2013; 9, 303-315.
 39. Pablos JL, Canete JD. Immunopathology of rheumatoid arthritis. *Curr Top Med Chem* 2013; 13: 705-11.
 40. Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005; 1: 102-10.
 41. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubari S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 455: 161-171.
 42. Bingham 3rd CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl*. 2002;65:3–9.

-
43. Lubberts E. The IL-23/IL-17 in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jul; 11(7): 415-29.
 44. Shegarfi, H; Naddafi, F; Mirshafiey, A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? *The Scientific World Journal*. 2012: 491974.
 45. Yoshida, H.; Miyazaki, Y. Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev* 2008;226:234-247.
 46. O'Shea J, Ma Am, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2, 37-45.
 47. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR J. Rheumatol*. 2007; 10: 270–274.
 48. Yamanaka H. TNF as a Target of Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015; 15(2):129-34.
 49. S. Masli, B. Turpie. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells *Immunology*. 2009; 27: 62–72.
 50. Sanmartí R, García-Rodríguez S, Álvaro J, Andreu JL, Balsa A, Cáliz R, Fernandez-Nebro A, Ferrez-Amaro I, Gómez-Reino JJ, González-Álvaro I, Martín Mola E, Martínez-Taboada VM, Ortiz AM, Tornero J, Marsal S, Moreno JV. 2014 Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the use of biologic therapies in rheumatoid arthritis. *Reumatología clínica*. 2015; 11(5): 279-274.
 51. Tornero Molina J, Sanmartí Sala R, Rodríguez Valverde V, Martín Mola E, Marengo de la Fuente JL, González Álvaro I, Muñoz Fernández S, Gómez-Reino Carnota J, Carreño Pérez L, Batlle Gualda E, Balsa Criado A, Andreu JL, Alvaro-Gracia JM, Martínez López JA, Loza Santamaría E. 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.
 52. Verstappen SM, Jacobs JW, Huisman AM, van Rijthoven AW, Sokka T, Bijlsma JW. Functional Health Assessment Questionnaire (HAQ) and Psychological HAQ Are Associated with and Predicted by Different Factors in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2007; 34(9): 1837-40.

-
53. Porter D, Gadsby K, Thompson P, White J, McClinton C, Oliver S. DAS28 and Rheumatoid Arthritis: The Need for Standardization. *Musculoskeletal care*. 2011; 9(4): 222-7.
54. Van der Heijde D, Theunisse LAM. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis : first step in the development. *Extrapolation*. 1990; (January): 916–20.
55. Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM, Jasani MK, Dalakos TG, Grieveson P BW. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med*. 1968; 37(147): 393-406.
56. Smolen JS. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*. 2003; 42(2): 244-57.
57. Felson D. Defining remission in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012; 71 Suppl 2(Suppl II): i86-8.
58. Tugwell P, Boers M, Baker P, Wells G SJ. Endpoints in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994; 21(42): 2-8.
59. Balsa A. ¿Cómo se evalúa una respuesta inadecuada en un paciente con artritis reumatoide en la práctica clínica? *Reumatología clínica*. 2007; 2(1): 38-44.
60. Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB van RP. Development and validation of the european league against rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis: Comparison with the preliminary american college of rheumatology and the world health organization/international league against rheumatism criteria. *Arthritis Rheum*. 1996; 39(1): 34-40.
61. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, Katz LM, Lightfoot R Jr, Paulus H, Strand V et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995; 38(6): 727-35.
62. Sociedad Española de Reumatología. *Guía de Práctica Clínica en España*. Madrid; 2011.
63. Kievit W, Adang EM, Fransen J, Kuper HH, van de Laar MA, Jansen TL, De Gendt CM, De Rooij DJ, Brus HL, Van Oijen PC, Van Riel PC. The effectiveness and medication costs of three anti-tumour necrosis factor alpha agents in the treatment of rheumatoid arthritis from prospective clinical practice data. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008; 67(9): 1229-34.
64. Marengo de la Fuente JL, Solís Díaz R. Anti-TNF drugs: New results on efficacy. *Reumatología clínica*. 2009; 5S1: 71-6.

-
65. Greenberg JD1, Reed G, Decktor D, Harrold L, Furst D, Gibofsky A, Dehoratius R, Kishimoto M, Kremer JM; CORRONA Investigators. A comparative effectiveness study of adalimumab, etanercept and infliximab in biologically naive and switched rheumatoid arthritis patients: results from the US CORRONA registry. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(7): 1134-42.
66. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics.* 2008; 117(2): 244-79.
67. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Seminars in arthritis and rheumatism.* 2005; 34(6): 819-36.
68. Ficha Técnica-Remicade[®].EMA. www.ema.europa.eu/ema/
69. Smolen JS, Han C, Bala M, Maini RN, Kalden JR, van der Heijde D, Breedveld FC, Furst DE, Lipsky PE; ATTRACT Study Group. Evidence of radiographic benefit of treatment with infliximab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients who had no clinical improvement: a detailed subanalysis of data from the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(4): 1020-30.
70. Smolen JS, Han C, van der Heijde DM, Emery P, Bathon JM, Keystone E, Maini RN, Kalden JR, Aletaha D, Baker D, Han J, Bala M, St Clair EW; Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset (ASPIRE) Study Group. Radiographic changes in rheumatoid arthritis patients attaining different disease activity states with methotrexate monotherapy and infliximab plus methotrexate: the impacts of remission and tumour necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(6): 823-7.
71. Wiens A, Correr CJ, Venson R, Grochocki MC, Otuki MF, Pontarolo R. A meta-analysis of the efficacy and safety of using infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology.* 2009; 28(12): 1365-73.
72. Ficha Técnica-Enbrel[®].EMA. www.ema.europa.eu/ema/
73. Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, Martín Mola E, Pavelka K, Sany J, Settas L, Wajdula J, Pedersen R, Fatenejad S, Sanda M; TEMPO (Trial of

-
- Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004; 363(9410): 675-81.
74. Ficha Técnica-Humira[®]. EMA. www.ema.europa.eu/ema/
75. Breedveld FC1, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL, Spencer-Green GT. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(1): 26-37.
76. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Kavanaugh AF, Chartash EK, Segurado OG. Long term efficacy and safety of adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4 year extended study. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(6): 753-9.
77. Furst DE, Schiff MH, Fleischmann RM, Strand V, Birbara CA, Compagnone D, Fischkoff SA, Chartash EK. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). *J Rheumatol*. 2003; 30(12): 2563-71.
78. Ficha Técnica-Simponi[®].EMA. www.ema.europa.eu/ema/
79. Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, Pazdur J, Bae SC, Palmer W, Zrubek J, Wiekowski M, Visvanathan S, Wu Z, Rahman MU; GO-FORWARD Study. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(6): 789-96.
80. Emery P, Fleischmann RM, Moreland LW, Hsia EC, Strusberg I, Durez P, Nash P, Amante EJ, Churchill M, Park W, Pons-Estel BA, Doyle MK, Visvanathan S, Xu W, Rahman MU. Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty -four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(8): 2272-83.

-
81. Smolen JS, Kay J, Doyle MK, Landewé R, Matteson EL, Wollenhaupt J, Gaylis N, Murphy FT, Neal JS, Zhou Y, Visvanathan S, Hsia EC, Rahman MU; GO-AFTER study investigators. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO- AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet*. 2009; 374(9685): 210-21.
 82. Ficha Técnica-Cimzia[®]. EMA. www.ema.europa.eu/ema/
 83. Keystone E, Heijde Dv, Mason D Jr, Landewé R, Vollenhoven RV, Combe B, Emery P, Strand V, Mease P, Desai C, Pavelka K. Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(11): 3319-29.
 84. Smolen J, Landewé RB, Mease P, Brzezicki J, Mason D, Luijgens K, van Vollenhoven RF, Kavanaugh A, Schiff M, Burmester GR, Strand V, Vencovský J, van der Heijde D. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2009 Jun; 68(6): 797-804.
 85. Fleischmann R1, Vencovsky J, van Vollenhoven RF, Borenstein D, Box J, Coteur G, Goel N, Brezinschek HP, Innes A, Strand V. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68(6): 805-11.
 86. Gartelehner G, Hansen RA, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: best current evidence. *Current opinion in Rheumatology*. 2007; 19: 308-13.
 87. Van GA, Anderson JJ, Van Riel PL, Boers M, Haagsma CJ, Rich B. ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999; 39: 34-40.
 88. Villaverde V, Balsa A, Cantalejo M, Fernandez-Prada M, Madero MR, Muñoz-Fernández S. Activity indexes in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000; 27: 2576-81.
 89. Anderson P, Louie J, Lau A, Broder M. Mechanisms of differential immunogenicity of tumor necrosis factor inhibitors. *Curr Rheumatol Rep*. 2005; 7: 3-9.
 90. Van Vollenhoven RF, Klareskog L. Clinical responses to tumor necrosis factor alpha

-
- antagonists do not show a bimodal distribution: data from Stockholm tumor necrosis alpha followup registry. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 1500-3.
91. Balsa A. ¿Qué significa la respuesta inadecuada a un antiTNF desde el punto de vista clínico? *Reumatología Clínica Suplementos.* 2008; 3(1): 2-6.
 92. Burmester GR, Ferraccioli G, Flipo RM, Monteagudo-Sáez I, Unnebrink K, Kary S, Kupper H. Clinical remission and/or minimal disease activity in patients receiving adalimumab treatment in a multinational, open-label, twelve-week study. *Arthritis Rheum.* 2008; 59(1): 32-41.
 93. Robinson WH, Lindstrom TM, Cheung RK, Sokolove J. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9:267-76.
 94. Burshka A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation.* Volume 2014 (2014): 21-24.
 95. Ramiro S, Machado P, Singh JA, Landewé RB, Pereira da Silva JA. Applying science in practice: the optimization of biological therapy in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research and Therapy.* 2010; 12(6): 220-8.
 96. Hyrich KL, Watson KD, Silman a J, Symmons DPM. Predictors of response to anti-TNF-alpha therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology (Oxford, England).* 2006; 45(12): 1558-65.
 97. Mancarella L, Bobbio-Pallavicini F, Ceccareli F, Falappone PC, Ferrante A, Malesci D. Good clinical response, remission, and predictors of remission in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor-alpha blockers: the GISEA study. *The Journal of Rheumatology.* 2007; 35(8): 1670-3.
 98. Jawaheer D, Olsen J, Hetland ML. Sex differences in response to anti -tumor necrosis factor therapy in early and established rheumatoid arthritis results from the DANBIO registry. *J Rheumatol.* 2012; 39(1): 46-53.
 99. Westhoff G, Rau R, Zink a. Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group. *Rheumatology (Oxford, England).* 2008; 47(6): 849-54.
 100. Matthey DL, Brownfield A, Dawes PT. Relationship between pack-year history of smoking and response to tumor necrosis factor antagonists in patients with rheumatoid

-
- arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2009; 36(6): 1180-7.
101. Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006; 45(10): 1223-9.
102. Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gülfe a, Söderlin M, Saxne T, Geborek P. Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008; 47(4): 495-9.
103. Verstappen SMM, van Albada-Kuipers GA, Bijlsma JW, Blaauw AA, Schenk Y, Haanen HC, Jacobs JW; Utrecht Rheumatoid Arthritis Cohort Study Group (SRU)- A good response to early DMARD treatment of patients with rheumatoid arthritis in the first year predicts remission during follow up. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(1): 38-43.
104. Listing J, Strangfeld A, Rau R, Kekow J, Gromnica-Ihle E, Klopsch T, Demary W, Burmester GR, Zink A. Clinical and functional remission: even though biologics are superior to conventional DMARDs overall success rates remain low results from RABBIT, the German biologics register. *Arthritis research & therapy*. 2006; 8(3): R66.
105. Keystone E, Freundlich B, Schiff M, Li J, Hooper M. Patients with moderate rheumatoid arthritis (RA) achieve better disease activity states with etanercept treatment than patients with severe RA. *The Journal of rheumatology*. 2009; 36(3): 522-31.
106. Bathon JM, Genovese MC. The Early Rheumatoid Arthritis (ERA) trial comparing the efficacy and safety of etanercept and methotrexate. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21(5 Suppl 31): S195-7.
107. Aletaha D, Funovits J, Keystone EC, Smolen JS. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*. 2007; 56(10): 3226-35.
108. Liang GC, Cordero M, Dyer A, Chang RW. Probability of remissions in patients with rheumatoid arthritis . Current Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor Use Is Associated with a Higher Probability of Remissions in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2005; 32(9): 4-8.

-
109. Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, Avasse S, Epis OM, Klersy C, Montecucco C. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(3): 302-7.
110. González-Alvaro I, Ortiz AM, Tomero EG, Balsa A, Orte J, Laffon A, García-Vicuña R. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(12): 1675-8.
111. Trocmé C, Marotte H, Baillet A, Pallot-Prades B, Garin J, Grange L, Miossec P, Tebib J, Berger F, Nissen MJ, Juvin R, Morel F, Gaudin P. Apolipoprotein A- I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(8): 1328-33.
112. Marotte H, Arnaud B, Diasparra J, Zrioual S, Miossec P. Association between the level of circulating bioactive tumor necrosis factor alpha and the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism at -308 in patients with rheumatoid arthritis treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Arthritis and rheumatism.* 2008; 58(5):1258-63.
113. Marotte H, Maslinski W, Miossec P. Circulating tumour necrosis factor-alpha bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response. *Arthritis research & therapy.* 2005; 7(1): R149-55.
114. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan J L. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis research & therapy.* 2011; 13(4): R126.
115. Alzabin S, Abraham SM, Taher TE, Palfreeman A, Hull D, McNamee K, Jawad A, Pathan E, Kin-derlerer A, Taylor PC, Williams R, Mageed R. Incomplete response of inflammatory arthritis to TNF α blockade is associated with the Th17 pathway. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(10): 1741-8.
116. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. Analysis of sinovial fluid and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology.* 2012; 51(3): 451-459.
117. Das S, Vital EM, Horton S, Bryer D, El-Sherbiny Y, Rawstron AC, Ponchel F, Emery P, Buch MH. Abatacept or Tocilizumab after Rituximab in Rheumatoid Arthritis? An exploratory study suggests non-response to rituximab is associated with persistently high

-
- IL-6 and better clinical response to IL-6 blocking therapy. *Ann Rheum Dis.* 2014 May;73(5):909-12.
118. Plant D, Wilson AG, Barton A. Genetic and epigenetic predictors of responsiveness to treatment in RA. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10: 329-337.
119. Owen SA. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 2013; 13: 137-47.
120. Cul J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM. Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to entanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet.* 2013;9, e10003394.
121. Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J, Fernández-Nebro A, Blanco F, González-Alvaro I, Cañete JD, Maymó J, Ballina J, Fernández-Gutiérrez J, Olivé A, Corominas H, Erra A, Canela-Xandri O, Alonso A, López Lasanta M, Tortosa R, Julià A, Marsal S. GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2013; 14:727-34.
122. Liu C, Batliwalla F, Li W, Lee A, Roubenoff R, Beckman E. Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-tnf treatment in rheumatoid arthritis. *Mol Med;* 2008 (14):575-578.
123. Chaves-Chaparro L, Salvatierra J, Raya E. Factores predictores de respuesta a terapias biológicas en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin.*2011;7:141-4.
124. Lee YH, Ji JD, Bae SC, Song GC. 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; 37:740-746.

Epigenética

125. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987; 238; 163-70.
126. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999; 286; 481-6.
127. Sanchez-Pernaute O. Las terapias epigenéticas, más allá de los biológicos en el tratamiento de la artritis reumatoide. *Reum Clin*. 2010; 6(6); 306-10.
128. Costenbader KH, Gay S, Alarcon-Riquelme ME, Iccarino J, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17: 526-31.
129. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128(4): 693-705.
130. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41 (16); 2381-402.
131. Ledenberg J. The meaning of epigenetics. *The scientist*. 2001; 15:6.
132. Morgan DK, Eitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*. 2008; 19(6): 349-7.
133. Wang Y, Ling Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet*. 2008; 74 (4): 307-15.
134. García Robles R, Ayala Ramirez Bac PA, Perdomo Velasquez B SP. Epigenetics: definition, molecular bases and implications in human health and evolution. *Rev Cienc Salud*. 2012; 10(1): 59-71.
135. Sato F, Rsuchiya S, Meltzer SJ. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; 278: 1598-609.
136. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011; 25(10):1010-22.
137. Gowers IR, Walters K, Kiss-Toth E et al. Age-related loss of CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter. *Cytokine* 2011; 56:792-7.
138. Nile CJ, Read RC, Akil M et al. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58:2686-93.

-
139. García R, Ayala P, Perdomo S. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev Cienc Salud*. 2012; 10(1): 59-71.
 140. Wu GC, Pan HF, Leng RX, Wang DG, Li XP, Li XM, Ye DQ. Emerging role of noncoding RNA in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2015; 14: 798-805.
 141. Keller A, Meese E. Can circulating miRNAs live up to the promise of being minimal invasive biomarkers in clinical settings? *WIREs RNA*. 2016; 7:148-156.
 142. Lee RC, Liu Y, He L. MicroRNAs: powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci*. 2009; 52: 323-30.
 143. Tuna M, Machado AS, Calin GA. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016; 55(3): 193-214.
 144. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14:475- 88.
 145. Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions- beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet*. 2014; 15:599-612.
 146. Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6:391-8.
 147. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120, 15-20.
 148. Bartel DP. Micro RNAs: genomics, mechanism, and Function. *Cell*. 2004; 116(2): 281–297.
 149. Bartel DP. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009; 136(2): 215–233.
 150. Trampe AL, Trujillo K. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina universitaria*. 2009; 11(44): 187-92.
 151. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; 10:399–416.
 152. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007; 128:669–81.
 153. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001; 293:1089–93.
 154. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects

-
- for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429:457–63.
155. Chen XM, Huang QC, Yang SL, Chu YL, Yan YH, Hang L, Huang Y, Huang RY. Role of microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Medicine*. 2015; 94(31): e1326.
156. Richardson B, Scheinbart L, Sthaler JR, Gross L, Hanash S, Johnson MA. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990; 33:1665–1673.
157. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2009; 60:3613–3622.
158. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72:110–117.
159. Hu R, O’Connell RM. MicroRNA control in the development of systemic autoimmunity. *Arthritis Research and Therapy*. 2013; 15: 202.
160. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, Suzuki O, Adachi N, Ochi M. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010; 11:209.
161. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10:R101.
162. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1582–1590.
163. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. A polymorphism in the 3’-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine*. 2010; 77:411–413.
164. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida, K, Ochi M, Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:1284–1292.
165. Li J, Wan Y, Guo Q, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12:R81.

-
166. Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011; 15:807–812.
167. Iliopoulos D, Kavousanaki M, Ioannou M, Boumpas D, Verginiset P. The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *Eur J Immunol*. 2011; 41:1754–1763.
168. Xu T, Huang C, Chen Z, Li J. MicroRNA-323-3p: a new biomarker and potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2014; 34:721–722.
169. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, Reilly J, Ierna M, Fraser AR, Stolarski B, McSharry C, Hueber AJ, Baxter D, Hunter J, Gay S, Liew FY, McInnes IB. Micro-RNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:11193–11198.
170. Niederer F, Trenkmann M, Ospelt C, Karouzakis E, Neidhart M, Stanczyk J, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Jüngel A, Kyburz D. Down-regulation of microRNA-34a in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum*. 2012;64: 1771–1779.
171. Nagata Y, Nakasa T, Mochizuki Y, Ishikawa M, Miyaki, Shibuya H, Yamasaki K, Adachi N, Asahara H, Ochi M. Induction of apoptosis in the synovium of mice with autoantibody-mediated arthritis by the intraarticular injection of double-stranded microRNA-15a. *Arthritis Rheum*. 2009; 60:2677–2683.
172. Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, Kumagai S. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60:1294–1304.
173. Jung SM, Kim KW, Yang CW, Park SH, Ju JH. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*. 2014; 2014:263625.
174. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1582–1590.
175. Chen SY. MicroRNA-223: a double-edged sword in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2014; 34:285–286.

-
176. Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, Suzuki O, Ochi M. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol*. 2013; 23:674–685.
177. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, Koenders MI, van den Berg WB, Smolen J, Redlich K. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1281–1288.
178. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, Gay R, Buckley CD, Tak PP, Gay S, Kyburz D. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:373–381.
179. Picascia A, Grimaldi V, Pignalosa O, de Pascale MR, Schiano C, Napoli C. Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clinical Immunology*. 2015; 157:1-15.
180. Duroux-Richard I, Jorgensen c, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:11-20.

Hipótesis

181. 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:S1.
182. Prajapati R, Plant D, Barton A. Genetic and genomic predictors of anti-TNF response. *Pharmacogenomics*. 2011;12:1571–85.
183. Plenge RM, Criswell LA. Genetic variants that predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis: current challenges and future directions. *Curr Opin Rheumatol*. 2008; 20:145–52.
184. Krintel SB, Grunert VP, Hetland ML, Johansen JS, Rothfuss M, Palermo G, et al. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology (Oxford)*. 2013; 52:1245–53.
185. Ortea I, Roschitzki B, Ovalles JG, Longo JL, de la Torre I, González I, et al. Discovery of serum proteomic biomarkers for prediction of response to infliximab (a monoclonal anti-

-
- TNF antibody) treatment in rheumatoid arthritis: an exploratory analysis. *J Proteomics*. 2012; 77:372–82.
186. Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13:229.
187. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R86.

Pacientes y Métodos

188. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham 3rd 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*, 69 (2010), pp. 1580-158.
189. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004 Mar; 26(6):509-15.

Discusión

190. Bruska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2014; 545493.
191. Fabre S, Dupuy AM, Dossat N et al. Protein biochip array technology for cytokine profiling predicts etanercept responsiveness in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008; 153(2): 188-95.
192. Van Venrooij WJ, van Beers JJBC, Pruijn GJM. AntiCCP antibody, a marker for the early detection of rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1143; 268-285.

-
193. Lequerré T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, et al. Gene profiling in White blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2006; 8(4): R105.
 194. Chen XM, Huang QC, Yang SL, Chu YL, Yan YH, Hang L, Huang Y, Huang RY. Role of microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Medicine*. 2015; 94(31): e1326.
 195. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12:R86.
 196. Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, Imura Y, Fujii T, Ito H, Mimori T. Comprehensive microRNA Analysis Identifies miR-24 and miR-125a-5p as Plasma Biomarkers for Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e69118.
 197. Wang W, Zhang Y, Zhu B, Duan T, Xu Q, Wang R, Lu L, Jiao Z. Plasma microRNA expression profiles in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Oncotarget*. 2015; 6(40): 42557-68.
 198. Flouri I, Markatseli TE, Voulgari PV, Boki KA, Papadopoulos I, Settas L, et al. Comparative effectiveness and survival of infliximab, adalimumab, and etanercept for rheumatoid arthritis patients in the Hellenic Registry of Biologics: Low rates of remission and 5-year drug survival. *Semin Arthritis Rheum*. 2014; 43:447–57.
 199. Navarro-Millán I, Curtis JR. Newest clinical trial results with antitumor necrosis factor and nonantitumor necrosis factor biologics for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 May; 25(3):384-90.
 200. 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; 39(1):34-40.
 201. Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Simmons DPM, Thomson W, Worthington J, Emery P, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs J, Barton A, and BRAGGSS. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not

-
- carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumor necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:69-74.
202. Braun Y, Markovits D, Zinder O, Schapira D, Rozin A, Ehrenburg M, Dain L, Hoffer E, Nahir AM, Balbir-Gurman A. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33:497-500.
203. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Mar ;51(3):451-9.
204. Zivojinovic SM, Pejnovic NN, Sefik-Bukilica MN, Kovacevic LV, Soldatovic II, Damjanov NS. Tumor necrosis factor blockade differentially affects innate inflammatory and Th17 cytokines in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2012 Jan; 39(1):18-21.
205. Das S, Vital EM, Horton S, Bryer D, El-Sherbiny Y, Rawstron AC, Ponchel F, Emery P, Buch MH. Abatacept or Tocilizumab after Rituximab in rheumatoid arthritis? An exploratory study suggests non-response to Rituximab is associated with persistently high IL-6 and better clinical response to IL-6 blocking therapy. *Ann Rheum Dis*. 2014 May; 73(5):909-12.
206. Uno K, Yoshizaki K, Iwahashi M, Yamana J, Yamana S, Tanigawa M, Yagi K. Pretreatment Prediction of Individual Rheumatoid Arthritis Patients' Response to Anti-Cytokine Therapy Using Serum Cytokine/Chemokine/Soluble Receptor Biomarkers. *PLoS One*. 2015 Jul 15; 10(7):e0132055.
207. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:224.
208. Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:R165.
209. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*. 2012; 160:198-206.

-
210. Luo X, Ranade K, Talker R, Jallal B, Shen N, Yao Y. microRNA-mediated regulation of innate immune response in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15:210.
 211. Salei E, Eftekhari R, Oraei M, Gharib A, Bidad K. MicroRNAs in rheumatoid Arthritis. *Clinical Rheumatology.* 2015; 34(4): 615-628.
 212. Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143:226–39.
 213. Duroux-Richard I, Pers YM, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, Touitou I, Jorgensen C, Apparailly F. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediat Inflamm.* 2014:342524.
 214. Zhou Q, Haupt S, Kreuzer JT, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, Leipe J, Witt M, Schulze-Koops H, Skapenko A. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(6):1265-74.
 215. Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, Filer A, Raza K, Buckley CD, Snow M, Vencovsky J, Pavelka K, Michel BA, Gay RE, Gay S, Jungel A. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(10):1898–1904.
 216. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(4):R101.
 217. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, Lood C, Knudsen S, Voss A, Harris CC, Hellmark T, Segelmark M, Jacobsen S, Bengtsson AA, Heegaard NH. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2013 May; 65(5):1324-34.
 218. Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, Suzuki O, Ochi M. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc.* 2013; 23(4):674–685.
 219. Deena Khan and S. Ansar Ahmed. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet.* 2015; 6: 236.

-
220. Mao J, Lv Z, Zhuang Y. MicroRNA-23a is involved in tumor necrosis factor- α induced apoptosis in mesenchymal stem cells and myocardial infarction. *Exp Mol Pathol*. 2014 Aug; 97(1):23-30.
221. Yang G, Wu D, Zeng G, Jiang O, Yuan P, Huang S, Zhu J, Tian J, Weng Y, Rao Z. Correlation between miR-126 expression and DNA hypomethylation of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Aug 1; 8(8):8929-36.
222. Ji JD, Cha ES, Lee WJ. Association of miR-146a polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*. 2014 Sep; 23(10):1023-30.
223. Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, Wang Y, Chen C1, Wang DW. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol*. 2013 Nov 16; 13:178.
224. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*. 1997; 278:860–6.
225. Ohtsui M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsui N, Okazaki H, Tsurui H, et al. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel Fc γ RIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. *Mod Rheumatol*. 2014; 27:1–8.
226. Panoulas VF, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Smith JP, Milionis HJ, Douglas KM, et al. Association of interleukin-6 (IL-6)-174G/C gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: the role of obesity and smoking. *Atherosclerosis*. 2009; 204:178–83.
227. Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275:31444–50.
228. Luyten FP, Lories RJ, Verschueren P, de Vlam K, Westhovens R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20:829–48.
229. Bartok B, Boyle DL, Liu Y, Ren P, Ball ST, Bugbee WD, et al. PI3 kinase δ is a key regulator of synoviocyte function in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 2012; 180:1906–16.

-
230. Eisenreich A, Rauch U. PI3K inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther.* 2011; 29:29–36.
231. Lories RJ, Daans M, Derese I, Matthys P, Kasran A, Tylzanowski P, et al. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1736–46.
232. Korkosz M, Gąsowski J, Leszczyński P, Pawlak-Buś K, Jeka S, Siedlar M, et al. Effect of tumour necrosis factor- α inhibitor on serum level of dickkopf-1 protein and bone morphogenetic protein-7 in ankylosing spondylitis patients with high disease activity. *Scand J Rheumatol.* 2014; 43:43–8.
233. Philippe L, Alsaleh G, Bahram S, Pfeffer S, Georgel P. The miR-17 approximately 92 cluster: a key player in the control of inflammation during rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2013; 4:70.
234. Duroux-Richard I, Pers YM, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, Touitou I, Jorgensen C, Apparailly F. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 342524.
235. Krintel SB, Dehlendorff C, Hetland ML, Horslev-Peterson K, Andersen KK, Junker P, Podenphant J, Ellingsen T, Ahlquist P, Lindegaard HM, Lanauskas A, Schelmmmer A, Dam MY, Hansen I, Horn IC, Jorgensen A, Raun J, Ammitzboll CG, Ostergaard M, Dtengaard-Pederson K, Johansen JS. Prediction of treatment response to adalimumab: a double-blind placebo-controlled study of circulating miRNA in patients with early rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal.* 2015: 1-6.
236. Pivarcsi A, Meisgen F, Xu N, Ståhle M, Sonkoly E. Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- α therapy. *Br J Dermatol.* 2013; 169:563–70.
237. Sharma AR, Sharma G, Lee SL, Chakraborty C. miRNA-regulated key components of cytokine signaling pathways and inflammation in rheumatoid arthritis. *Medical Research Reviews.* 2016 Jan 20: 1-15.

Anexos

La presente tesis doctoral ha derivado en la publicación de un artículo y dos comunicaciones a congresos, uno nacional y otro internacional, y ha sido la base para la solicitud de la patente europea:

1. Castro-Villegas C, Pérez-Sánchez C, Escudero A, Filipescu I, Verdu M, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Jiménez-Gómez Y, Font P, Rodríguez-Ariza A, Peinado JR, Collantes-Estévez E, González-Conejero R, Martínez C, Barbarroja N, López-Pedreira C.

Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF α . *Arthritis Res Ther*. 2015 Mar 9; 17:49. doi: 10.1186/s13075-015-0555-z.

Received: 7 August 2014, Accepted: 13 February 2015, Published: 9 March 2015

2. 40 Congreso de la Sociedad Española de Reumatología, celebrado en Santiago de Compostela, del 20 al 23 de Mayo 2014.

Acceptado como póster: Póster número 148: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICRORNAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB.

N. Barbarroja¹, C. Castro¹, C. Pérez-Sánchez¹, P. Ruiz-Limón¹, M.A. Aguirre¹, A. Escudero¹, Y. Jiménez-Gómez¹, R.M. Carretero-Prieto¹, P. Font¹, E. Collantes-Estévez¹, R. González-Conejero², C. Martínez² y C. López-Pedreira¹

¹Unidad de Investigación y Servicio de Reumatología.IMIBIC/Hospital Reina Sofía. Córdoba. ²Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Murcia.

Publicado Abstract en: *Reumatol Clin*. 2014; 10(Espec Cong):25-194

3. EULAR Congress 2014, celebrado en Roma, Italia, del 12 al 14 de Junio de 2014.

Comunicación oral. [OP0188] CIRCULATING MIRNAS AS POTENTIAL BIOMARKERS OF THERAPY EFFECTIVENESS IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH ANTI-TNF. N. Barbarroja¹, M. C. Castro¹, C. Perez-Sanchez¹, P. Ruiz-Limon¹, M. A. Aguirre¹, A. Escudero¹, Y. Jimenez-Gomez¹, R. M. Carretero¹, P. Font¹, E. Collantes-Estevez¹, R. Gonzalez-Conejero², C. Martinez², C. Lopez-Pedreira¹. ¹Research Unit/Rheumatology, Reina Sofia Hospital-Imibic, Cordoba; ²Regional Centre for Blood Donation, University of Murcia, Murcia, Spain.

Publicado Abstract en *Ann Rheum Dis* 2014; 73(Suppl2): 133-134.

4. Solicitud de patente europea

Título: Cirulating miRNAs as biomarkers of therapy effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients treated with antiTNF.alpha.

Autores: Lopez Pedrera Ch, Collantes Estevez E, Castro C, Pérez Sánchez C, Ruiz Limón P, Barbarroja N, Jiménez Gómez Y.

Nº Solicitud: EP 14382178.3

Entidad titular: Servicio andaluz de Salud

Fecha de prioridad: 2014

Países: EU

Situación: Aprobada

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF α

Carmen Castro-Villegas^{1†}, Carlos Pérez-Sánchez^{1†}, Alejandro Escudero¹, Ileana Filipescu², Miriam Verdu¹, Patricia Ruiz-Limón¹, Ma Angeles Aguirre¹, Yolanda Jiménez-Gomez¹, Pilar Font¹, Antonio Rodríguez-Ariza¹, Juan Ramon Peinado³, Eduardo Collantes-Estévez¹, Rocío González-Conejero⁴, Constantino Martínez⁴, Nuria Barbarroja^{1†} and Chary López-Pedra^{1*†}

Abstract

Introduction: The advent of anti-tumor necrosis factor alpha (anti-TNF α) drugs has considerably improved medical management in rheumatoid arthritis (RA) patients, although it has been reported to be ineffective in a fraction of them. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that act as fine-tuning regulators of gene expression. Targeting miRNAs by gain or loss of function approaches have brought therapeutic effects in various disease models. The aim of this study was to investigate serum miRNA levels as predictive biomarkers of response to anti-TNF α therapy in RA patients.

Methods: In total, 95 RA patients undergoing anti-TNF α /disease-modifying antirheumatic drugs (anti-TNF α /DMARDs) combined treatments were enrolled. Serum samples were obtained at 0 and 6 months and therapeutic efficacy was assessed. miRNAs were isolated from the serum of 10 patients before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy, cDNA transcribed and pooled, and human serum miRNA polymerase chain reaction (PCR) arrays were performed. Subsequently, selected miRNAs were analyzed in a validation cohort consisting of 85 RA patients. Correlation studies with clinical and serological variables were also performed.

Results: Ninety percent of RA patients responded to anti-TNF α /DMARDs combination therapy according to European League Against Rheumatism (EULAR) criteria. Array analysis showed that 91% of miRNAs were overexpressed and 9% downregulated after therapy. Functional classification revealed a preponderance of target mRNAs involved in reduction of cells maturation - especially on chondrocytes - as well as in immune and inflammatory response, cardiovascular disease, connective tissue and musculoskeletal system. Six out of ten miRNAs selected for validation were found significantly upregulated by anti-TNF α /DMARDs combination therapy (miR-16-5p, miR-23-3p, miR125b-5p, miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-223-3p). Only responder patients showed an increase in those miRNAs after therapy, and paralleled the reduction of TNF α , interleukin (IL)-6, IL-17, rheumatoid factor (RF), and C-reactive protein (CRP). Correlation studies demonstrated associations between validated miRNAs and clinical and inflammatory parameters. Further, we identified a specific plasma miRNA signature (miR-23 and miR-223) that may serve both as predictor and biomarker of response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy.

Conclusions: miRNA levels in the serum of RA patients before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy are potential novel biomarkers for predicting and monitoring therapy outcome.

* Correspondence: rosario.lopez.exts@juntadeandalucia.es

†Equal contributors

¹Maimonides Institute for Research in Biomedicine of Cordoba (IMIBIC)/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Avenida Menéndez Pidal S-N, E-14004 Cordoba, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, inflammatory, autoimmune disorder of unknown etiology that affects primarily the articular cartilage and bone. Characteristic features of RA pathogenesis are persistent inflammation, synovium hyperplasia and cartilage erosion accompanied by joint swelling and joint destruction [1]. Early treatment can prevent severe disability and lead to remarkable patient benefits, although a lack of therapeutic efficiency in a considerable number of patients remains problematic.

Tumor necrosis factor alpha (TNF α) plays a central role in the pathogenesis of RA and is instrumental in causing joint destruction, the clinical hallmark of the disease. It induces macrophages and other cells to secrete proinflammatory cytokines (that is interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8), leads to T cell activation, and induces endothelial cells to express adhesion molecules [2]. TNF α is involved in the differentiation and maturation of osteoclasts (the main cells involved in arthritic bone destruction), and stimulates fibroblasts, osteoclasts and chondrocytes to release proteinases, which destroy articular cartilage and bone [2,3].

The introduction of anti-TNF therapy has significantly improved the outlook for patients suffering from RA. Yet, a substantial proportion of patients fail to respond to these therapies [4]. Treatment response is likely to be multifactorial; however, variation in genes or their expression may identify those most likely to respond [5]. By targeted testing of variants within candidate genes, potential predictors of anti-TNF response have been reported [6]. However, very few markers have been replicated consistently between studies. Other potential serum biomarkers of response have also been explored including cytokines and autoantibodies, with antibodies developing to the anti-TNF drugs themselves being correlated with treatment failure [7-9].

More recently, epigenetic anomalies are emerging as key pathogenic features of RA. The effects of epigenetics in RA range from contributing to complex disease mechanisms to identifying biomarkers for early diagnosis and response to therapy. Key epigenetic areas in RA have been evaluated namely DNA methylation, histone modification, and expression and/or function of microRNAs [10]. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that, depending upon base pairing to messenger RNA (mRNA) mediate mRNA cleavage, translational repression or mRNA destabilization. miRNAs are involved in crucial cellular processes and their dysregulation has been described in many cell types in different diseases [1]. In fact, abnormalities in miRNA expression related to inflammatory cytokines, T helper 17 (Th-17) and regulatory T cells as well as B cells have been described in several autoimmune diseases [11]. Over the

past several years it has become clear that alterations exist in the expression of miRNAs in patients with RA. Increasing number of studies have shown that dysregulation of miRNAs in peripheral blood mononuclear cells [12], isolated T lymphocytes [13], synovial tissue and synovial fibroblasts - that are considered key effectors cells in joint destruction - [14-16], contributes to inflammation, degradation of extracellular matrix and invasive behavior of resident cells. Moreover, altered expression of miRNA in plasma and synovial fluid of RA patients has been demonstrated [17].

It has been established that miRNAs can be aberrantly expressed even in the different stages of RA progression, allowing miRNAs to help monitor disease severity and understand its pathogenesis [10]. Yet, to date no study has evaluated the changes that occurred in the profile of serum miRNAs in RA patients after anti-TNF α therapy. Therefore, to identify possible biomarkers predictive of the therapeutic effect of anti-TNF α drugs in RA, we investigated serum miRNA changes after 6 months of treatment.

Methods

Patients

Ninety-five RA patients were included in the study (during a period of 24 months) after obtaining approval from the ethics committee of the Reina Sofia Hospital from Cordoba (Spain). All the RA patients fulfilled the American College of Rheumatology criteria for the classification of RA [18]. Patients provided written informed consent.

All patients had inadequate response to at least two disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), one of which was methotrexate. Patients received DMARDs in monotherapy or in combination therapy. Only patients who were naïve to anti-TNF α agents were included in the study. Therapy with anti-TNF α agents was stable during the study and was associated to DMARDs (Table S5 in Additional file 1). Within the cohort, 55 patients were given infliximab (IFX; 3 mg/kg/day intravenous infusion at times 0, 2 and 6 weeks, and every 8 weeks thereafter); 25 received etanercept (ETA, 25 mg subcutaneously twice weekly), and 15 patients were treated with adalimumab (ADA; 40 mg subcutaneously every week) for 6 months. Blood samples were obtained before the start and at the end of the treatment. To avoid blood composition changes promoted by diet and circadian rhythms, samples were always collected in the early hours in the morning and after a fasting period of 8 hours.

Clinical and laboratory parameters of the RA patients included in the treatment protocols are displayed in Table 1. Patients were evaluated clinically and analytically at baseline (T1) and 6 months of treatment (T2).

Table 1 Clinical characteristics of rheumatoid arthritis patients recruited to the study

	Exploratory cohort (n = 10)	Validation cohort (n = 85)
Sex (male/female)	1/9	11/74
Age, mean (range)	54.6 (38-74)	53.6 (24-72)
Disease duration (y), mean (range)	10.1 (2-23)	10.4 (1-36)
Smoking, number (%)	4 (40%)	23 (27.1%)
TJC, mean	13.7 ± 5.8	15.7 ± 4.6
SJC, mean	16.9 ± 6.5	11.5 ± 3.7
DAS28, mean	5.9 ± 0.7	5.7 ± 0.6
SDAI	39.7 ± 14.9	36.3 ± 10.9
HAQ	2.14 ± 0.5	2.1 ± 0.3
ESR (mm), mean	55 ± 18.62	55.9 ± 16.6
CRP (mg/dL), mean	3.6 ± 1.12	3.8 ± 2.1
Positive rheumatoid factor, n (%)	7 (70%)	60 (70.6%)
Positive anti-CCP antibody, n (%)	4 (40%)	59 (69.4%)
Medication, n (%)		
Infliximab	9 (90%)	46 (54.1%)
Etanercept	1 (10%)	24 (28.2%)
Adalimumab	0	15 (17.6%)
Corticoids, n (%)	4 (40%)	55 (64.7%)
Hydroxychloroquine, n (%)	3 (30%)	22 (25.9%)
Azathioprine, n (%)	0 (0%)	5 (5.9%)
Metotrexate, n (%)	7 (70%)	58 (68.2%)
Sulfasalazine, n (%)	1 (10%)	7 (8.2%)
Cyclosporine, n (%)	1 (10%)	2 (2.4%)
Leflunomide, n (%)	2 (20%)	33 (38.8%)

TJC, tender joint count; SJC, swollen joint count; DAS28, disease activity score; SDAI, simplified disease activity index; HAQ, health assessment questionnaire; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies.

Clinical assessment included swollen joint count (SJC), tender joint count (TJC), visual analog scale of pain (VAS; range 1 to 100 mm) of patient and clinician, simple disease activity index (SDAI), health assessment questionnaire (HAQ) and number of DMARDs associated with anti-TNF α treatment. Serological evaluation included analysis of rheumatoid factor (RF), anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCPs), C-reactive protein (CRP, mg/L) and erythrocyte sedimentation rate (ESR, mm/h).

Response to anti-TNF α /DMARDs combination treatment was assessed by the (European League Against Rheumatism (EULAR) criteria, based on the 28-joint disease activity score (DAS28). The patients were categorized into responders and non-responders based on the change in the DAS28 score. An improvement in DAS28 over ≥ 1.2 and a DAS28 value ≤ 3.2 after 6 months

of treatment was considered a good response; a DAS28 value after 6 months between 3.2 and 5.1 and a reduction between 0.6 and 1.2 was considered a moderate response. Both of them were considered responders to the therapy. DAS28 score at T2 > 5.1 or a reduction in DAS28 under 0.6 was considered a non-response.

Blood sample collection and assessment of biological parameters

Whole blood from subjects was collected by direct venous puncture either, into tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant, or into specific tubes for obtaining serum. All the blood was processed for the isolation of plasma or serum within 4 h of collection. The blood was processed by spinning at $2,000 \times g$ for 10 min at room temperature. Then, plasma and serum were transferred to a fresh RNase-free tube and stored at -80°C . RF was measured by immunoturbidimetric assay (Quantia RF kit, Abbot Laboratories, Chicago, IL, USA) and concentrations >30 IU/mL were considered positive. Determination of anti-CCP antibody was tested with the EDIATM anti-CCP kit (Euro Diagnostica, Malmö, Sweden). Positive anti-CCP titers were considered at a concentration of >5 U/mL.

Plasmatic levels of IL-6, IL-4, IL-17, IL-22, IL-23, monocyte chemotactic protein (MCP-1), TNF α , soluble TNF receptor II (sTNFR II) and vascular endothelial growth factor (VEGF) at T1 and T2 were quantified using cytofluorometry-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique in accordance with manufacturer's instructions using FlowCytomix kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). Results were calculated using the FlowCytometry Pro software (eBioscience).

Isolation of microRNAs from serum

Total RNA, including the miRNA fraction, was extracted from serum by using the QIAzol miRNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) with some modifications. A total of 200 μl of serum were thawed on ice and lysed in 1 mL QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Samples in QIAzol were incubated at room temperature for 5 min to inactivate RNases. To adjust for variations in RNA extraction and/or copurification of inhibitors, 5 fmol of spike-in non-human synthetic miRNA (*C. elegans* miR-39 miRNA mimic: 5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3') were added to the samples after the initial denaturation. The remaining extraction protocol was performed according to the manufacturer's instruction. Total RNA was eluted in 14 μl of RNase-free water and stored at -80°C .

MicroRNA expression profiling

To identify the changes that occurred in the expression levels of miRNAs in serum from patients treated with anti-TNF α /DMARDs combination therapy, a Human

Serum & Plasma miRNA PCR array (Qiagen) was performed. This array profiles the expression of 84 miRNAs detectable and differentially expressed in serum, plasma, and other bodily fluids. Those miRNAs have been carefully selected based on published results that suggest a correlation with serum expression levels and specific diseases. A pool with 2 μ l from RNA purified from 10 optimal responder RA patients before treatment, and another pool with 2 μ l from RNA purified from the same 10 patients after treatment was performed.

In a reverse-transcription reaction using miScript HiSpec Buffer from the miScript II RT kit (Qiagen), mature miRNAs were polyadenylated by poly(A) polymerase and subsequently converted into cDNA by reverse transcriptase with oligo-dT priming. The formulation of miScript HiSpec Buffer facilitated the selective conversion of mature miRNAs into cDNA, while the conversion of long RNAs, such as mRNAs was suppressed. As a result, background signals potentially contributed by long RNA were non-existent.

The cDNA prepared in a reverse-transcription reaction was used as a template for real-time PCR analysis using miScript miRNA PCR array (which contains miRNA-specific miScript Primer Assays) and the miScript SYBR Green kit, (which contains the miScript Universal Primer -reverse primer- and QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix). To profile the mature miRNA expression, a premix of cDNA, miScript Universal Primer, QuantiTect SYBR Green PCR Master MIX, and RNase-free water, was added to a miScript miRNA PCR array. That array was provided in a 96-well plate format and included replicates of a miRNA reverse transcription control assay (miRTC) and a positive PCR control (PPC). Those were the quality control assays used to determine the presence of reverse transcription and real-time PCR inhibitors.

Raw data were analyzed with the data analysis software for miScript miRNA PCR arrays. The expression levels of miRNAs were normalized to the mean of spiked-in miRNA Cel-miR-39 and were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Quantitative real-time PCR

A fixed volume of 3 μ l of RNA solution from the 14 μ l eluate from RNA isolation of 200 μ l serum sample was used as input into the reverse transcription. Input RNA was reverse transcribed using the TaqMan miRNA Reverse Transcription kit and miRNA-specific stem-loop primers (Life Technologies, Madrid, Spain). The reaction was conducted in a GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) at 16°C for 30 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. A preamplification step was performed at 95°C for 10 min, 20 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 4 min. Real-time PCR was carried out on a

Roche LightCycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min using the TaqMan microRNA assay together with TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). Data were normalized to the mean of spiked-in miRNA Cel-miR-39. The Ct mean values of the spiked-in miRNA Cel-miR-39 in the groups T1 and T2 were 16.10 and 16.20 respectively. BestKeeper software was used to evaluate whether this miRNA was a good reference miRNA [19]. After uploading each Ct value in the Excel spreadsheet, the BestKeeper standard deviation (SD) value was lower than 1, thus considering this miRNA as a good stable housekeeping gene for our experimental conditions. The expression levels of miRNAs were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed with SSPS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Following normality and equality of variance tests, clinical characteristics were compared using paired Student's *t* test or alternatively by a nonparametric test (Mann-Whitney rank sum test). Paired samples within the same subjects were compared by Wilcoxon signed-rank test. Differences among groups of treatment were analyzed by repeated measures ANOVA. Correlations were assessed by Spearman's rank correlation. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses, plotting the true positive rate (sensitivity) vs. the false positive rate (1-specificity) at various threshold settings were performed for serum miRNAs, and the areas under the curve (AUCs) were calculated with SPSS. ROC analysis for miRNA-combined, arithmetic mean of level expression was calculated from two miRNAs selected with the highest efficiency values. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Clinical response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy

Within the cohort, 83 patients were female (87%) and 12 male (13%) with median disease duration of 9 (4 to 14) years. At the start of the anti-TNF α /DMARDs combination therapy all subjects showed high disease activity, reflected by a mean DAS28 of 5.67 (5.29 to 6.11) despite a median number of 2.35 DMARDs agents used concomitantly (range 1 to 3). All patients took non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) daily and 65% of them received steroid treatment (range 5 to 15 mg/d prednisone). Methotrexate alone or in combination was administered in 68.4% of subjects.

According to DAS28 response criteria, 90% of patients were responders to anti-TNF α /DMARDs combination therapy. At 6 months of therapy most of the clinical parameters evaluated (including TJC, SJC, SDAI, and HAQ) improved significantly. All three biological agents had a favorable influence on the evolution of those parameters (Tables S1 and S2 in Additional file 1). Several auto-immune and serological parameters (such as RF, PCR, ESR, IL6, IL17, and TNF α) were further significantly reduced when patients were classified in responder vs. non-responder (Table 2). Thus, we chose the time after starting therapy to assess serum miRNAs changes.

Differentially expressed miRNAs in the serum of RA patients before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy

To evaluate the expression of serum miRNAs before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy, we profiled miRNA spectra from pools of RNA purified from 10 RA serum samples before treatment and 10 RA serum samples after treatment (exploratory cohort). We tested 84 miRNAs during this analysis process. In this profile, the expression levels of 75 miRNAs were found

increased, while 9 miRNAs decreased after treatment (Figure 1A).

A detailed analysis of the altered miRNAs in response to anti-TNF α /DMARDs combination treatment, by using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA), showed that a large number of them had target mRNAs involved in immune and inflammatory response, cardiovascular system development and function, or connective tissue and musculoskeletal system. Interestingly, among all the potential effects, we found a cluster of miRNAs (which increased after therapy) that may result in a significant impact on the reduction of the maturation of cells, especially on chondrocytes. Also our results seem to indicate that G1 phase transition may be inhibited (Figure 1B).

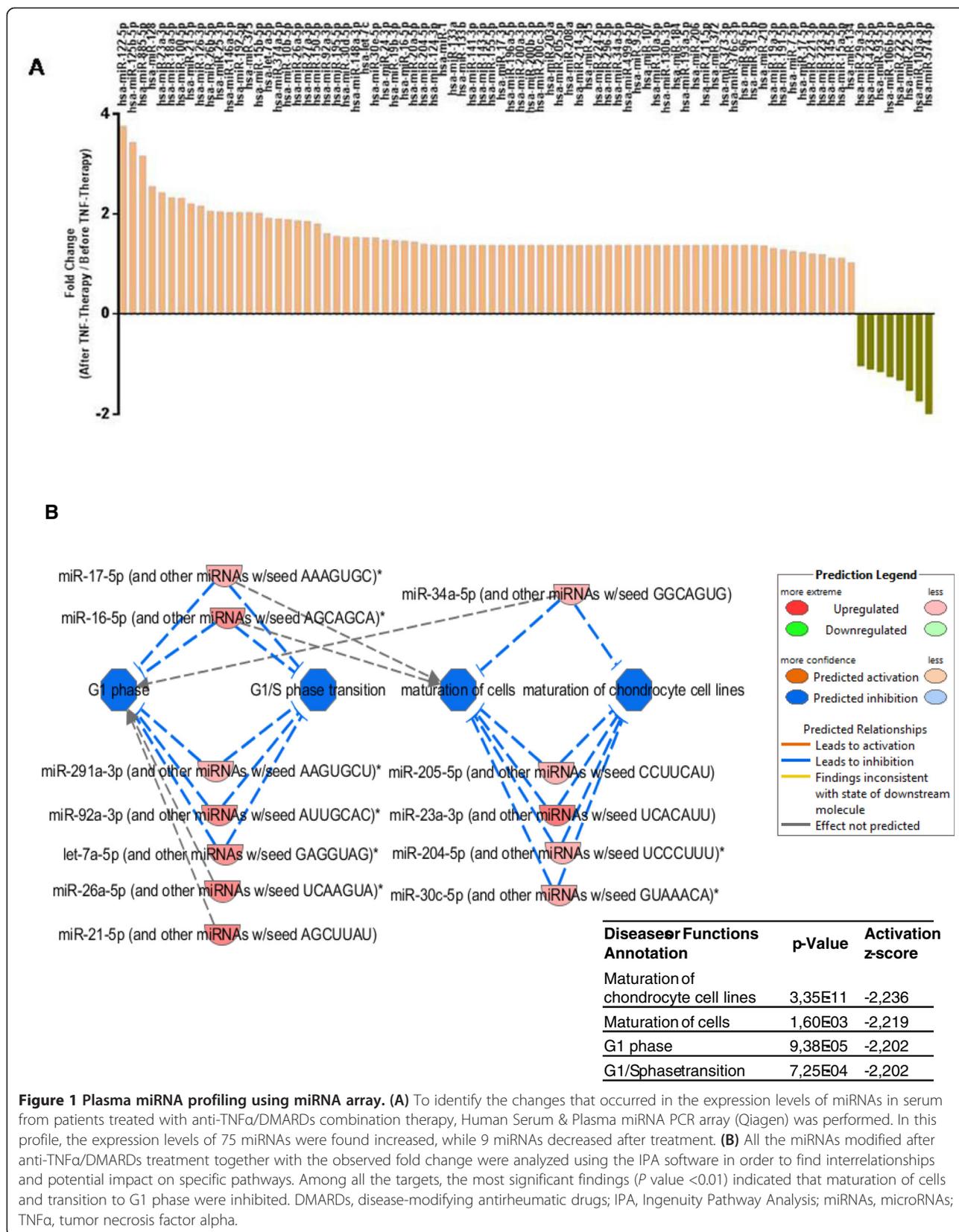
Validation of the differentially expressed miRNAs

To validate the PCR array data, five miRNAs differentially expressed, showing at least 2-fold change between the two conditions, were selected (hsa-miR-125b, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-3p and hsa-miR-146a-5p). A second group of five miRNAs under 2-fold change but involved in processes such as inflammation, cardiovascular and autoimmune diseases, and

Table 2 Changes operated on clinical and laboratory parameters after anti-TNF α /DMARDs treatment in responder and non-responder RA patients

	Responders (N = 85)			Non-responders (N = 10)		
	Before anti-TNF treatment	After anti-TNF treatment	P	Before anti-TNF treatment	After anti-TNF treatment	P
Clinical assessments						
TJC	15.9 \pm 4.8	5.1 \pm 2.2	0.000	15.6 \pm 5.1	8.5 \pm 2.9	0.005
SJC	11.7 \pm 3.9	2.9 \pm 1.8	0.000	11.6 \pm 4.9	5.1 \pm 2.7	0.005
DAS28	5.8 \pm 0.6	3.3 \pm 0.7	0.000	5.5 \pm 0.7	4.3 \pm 0.6	0.005
SDAI	36.3 \pm 11.4	2.9 \pm 6.8	0.000	39.2 \pm 11.8	5.7 \pm 12.1	0.005
HAQ	2.1 \pm 0.3	1 \pm 0.4	0.000	2.1 \pm 0.3	1 \pm 0.3	0.008
Serological assessments						
ESR (mm/h)	56.4 \pm 17.2	27.9 \pm 18.5	0.000	51.4 \pm 11.9	37.6 \pm 19.3	ns
CRP (mg/L)	3.9 \pm 2.1	1.5 \pm 1.2	0.000	2.2 \pm 0.8	2.5 \pm 0.9	ns
RF (U/L)	155.2 \pm 288.3	85.4 \pm 241	0.000	61.2 \pm 84.3	20.8 \pm 39.9	0.027
IL-6 (pg/mL)	9.4 \pm 46.7	1.4 \pm 6.8	0.000	2.1 \pm 5.6	0	ns
TNF (pg/mL)	14.9 \pm 28.8	5.7 \pm 6.1	0.038	4.1 \pm 4.5	4.7 \pm 5.1	ns
sTNFR II (pg/mL)	1.5 \pm 0.9	1.5 \pm 0.7	ns	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.7	ns
MCP-1 (pg/mL)	1174.8 \pm 1615.4	1216.4 \pm 1655.4	ns	740 \pm 504.6	678.6 \pm 221.8	ns
VEGF (pg/mL)	1107.7 \pm 1360.9	830.3 \pm 570.1	ns	796.7 \pm 462.7	1077.9 \pm 711.6	ns
IL23 (pg/mL)	115 \pm 235.5	76.8 \pm 132.9	ns	41.2 \pm 30.5	223.5 \pm 424.8	ns
IL22 (pg/mL)	46.3 \pm 112	17.2 \pm 29.2	ns	8.4 \pm 8.1	104.9 \pm 193.3	ns
IL17 (pg/mL)	4.8 \pm 8.5	2.1 \pm 2.1	0.024	11.9 \pm 19.1	1.4 \pm 1.4	ns
IL4 (pg/mL)	22.8 \pm 17.6	14.9 \pm 16.2	ns	4.2 \pm 6	12.8 \pm 18.2	ns

TNF α , tumor necrosis factor alpha; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; RA, rheumatoid arthritis; T1 baseline; T2 at 6 months; TJC, tender joint count; SJC, swollen joint count; DAS28, disease activity score; SDAI, simplified disease activity index; HAQ, health assessment questionnaire; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; RF, rheumatoid factor; IL-6, interleukin 6; TNF, tumor necrosis factor; sTNFR II , soluble tumor necrosis factor receptor type II; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; IL-23, interleukin 23; IL-22, interleukin 22; IL-17, interleukin 17; IL-4, interleukin 4.



RA were also selected (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-124a-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-223-3p). The changes that occurred in the expression of the selected miRNAs were evaluated in all the patients included in the study. In total population, six of the ten miRNAs clearly distinguished RA serum samples after anti-TNF α /DMARDs combination therapy with high confidence level ($P < 0.05$): (hsa-miR-125b, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-23-3p, and hsa-miR-223-3p) all of them being increased after treatment (Figure 2A; Tables S3 and S4 in Additional file 1).

These differences were found even more relevant when patients were divided in responders and non-responders, so that while miRNA expression levels strongly increased in responders, they did not change in non-responder patients after anti-TNF α /DMARDs combination therapy

(Figure 2B, and Figure S4 in Additional file 2). Moreover, in responders, a parallel change was observed in the expression levels of autoimmune parameters such as the RF and of some cytokines such as TNF α , IL-6 or IL-17, which were found significantly reduced after treatment (Table 2).

Regulation network of differentially expressed serum miRNAs in the inflammatory pathways and processes of rheumatoid arthritis

It is widely accepted that miRNAs can influence gene expression by causing translational repression or mRNA degradation. This dysregulation can alter several downstream pathways and manifest effects. By using the IPA software, we further investigated the potential gene targets for the six validated miRNAs and analyzed their participation in the different canonical pathways (Figure 3).

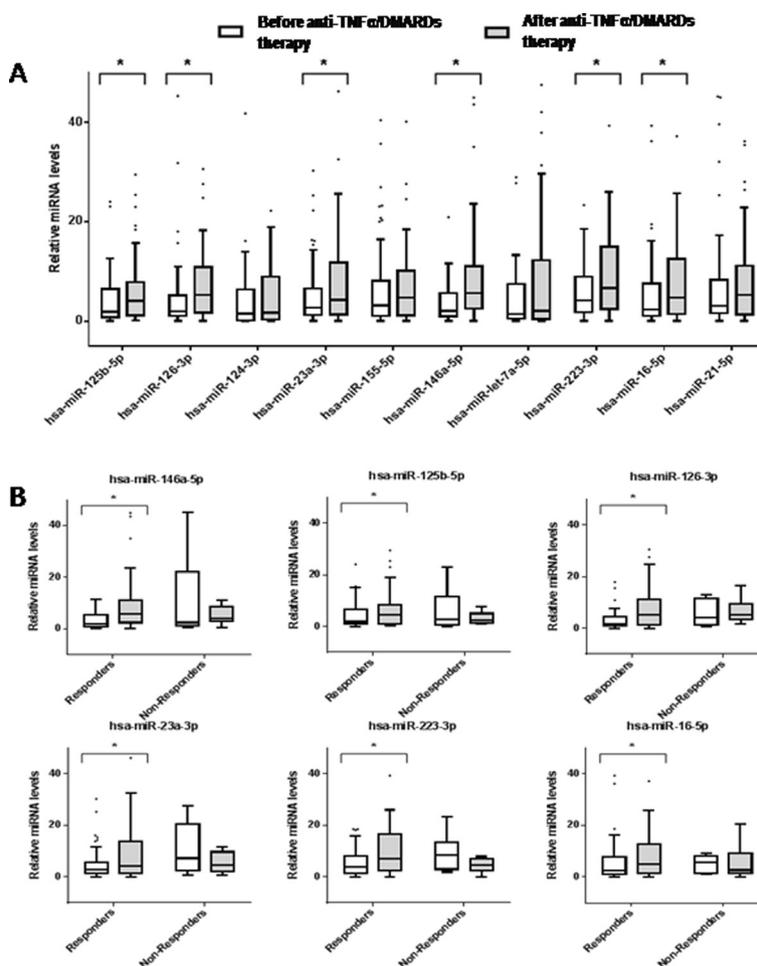


Figure 2 Relative miRNA levels at start (T1) and after six months of anti-TNF α /DMARDs combination therapy (T2) in the validation cohort (n = 85). To validate the PCR array data, ten miRNAs differentially expressed were selected (hsa-miR-125b, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-124a-3p, hsa-miR-155-5p, and hsa-miR-223). **(A)** Relative expression levels of each miRNA are shown. Boxes indicate the interval between the 25th and 75th percentiles and horizontal bars inside boxes indicate median. Whiskers indicate the interval of data within 1.5 \times interquartile ranges (IQR). Closed circles indicate data points outside 1.5 \times IQR. * $P < 0.05$. **(B)** Comparison of relative change of miRNA levels between responders and non-responders groups for the six miRNAs found significantly altered after therapy in the validation cohort. * $P < 0.05$. DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; miRNAs, microRNAs; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

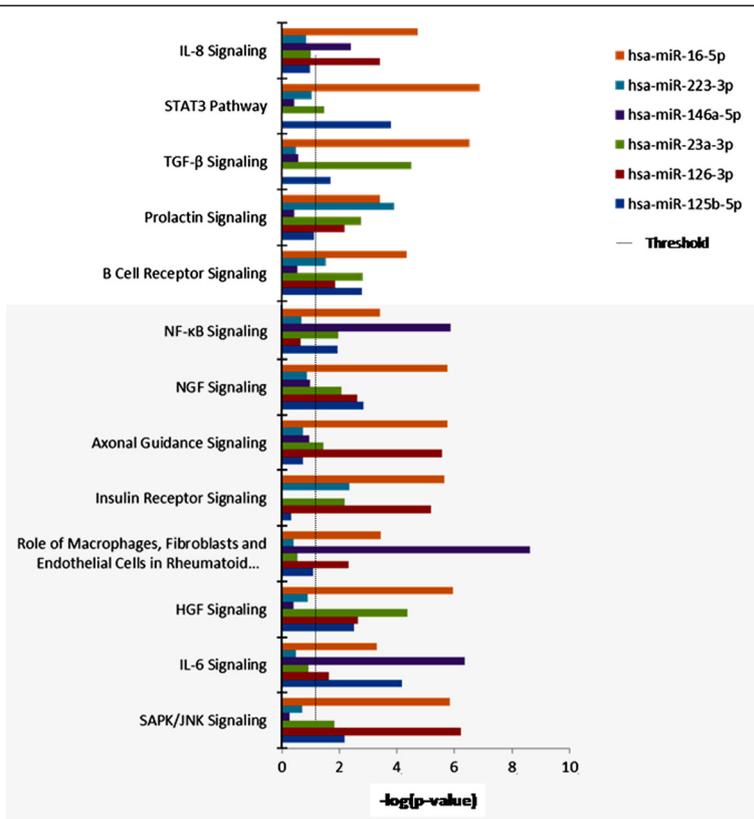


Figure 3 Participation of the six validated miRNAs in the different canonical pathways. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) uncovered the main enriched biological pathways on which that miRNAs are involved. The analysis included only the pathways with average IPA score >2 (indicated as $-\log(P \text{ value})$). miRNAs, microRNAs.

The study, in which only the pathways with average IPA score >2 ($-\log(P \text{ value})$) were included, revealed that the most probable genes modified by these miRNA correspond to pathways directly related to RA (that is, the role of macrophages, fibroblasts and endothelial cells in RA, the role of osteoblasts, osteoclasts and chondrocytes in RA, and the role of IL-17A in RA). Pathways related to STAT-3 or IL-6 signaling (both of them crucial for the induction and maintenance of the inflammatory status present in RA patients), were also identified.

To better understand the significance of the results, we investigated the potential impact of the verified miRNAs directly on the RA-related pathways. A deeper analysis of the miRNA targets demonstrated that RA-related canonical pathways may be regulated at different levels (grey-filled symbols of genes in Figure S1 in Additional file 3; Figure S2 in Additional file 4; and Figure S3 in Additional file 5). It is also interesting to note that in this study we found that several genes were the targets of more than one of the verified miRNAs (Table 3). For example, the gene that codifies for conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (CHUK) may be potentially regulated by four out of the six miRNAs. Other genes directly related to RA are multiple targets for these miRNAs, such as IL6

receptor alpha (IL6R) and beta (IL6ST) chains, fibroblast growth factor 2 (FGF2), and the bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII). Interestingly, a number of both miRNA and mRNA targets uncovered in that analysis were found complementary altered after anti-TNFα/DMARDs combination therapy in our patient’s cohort (that is IL-6 or IL-17 serum levels).

Changes in serum miRNAs correlate with changes in clinical variables in RA patients

To assess the possibility of serum miRNAs as biomarkers of RA and of response to therapy, we investigated the correlation of validated miRNAs with clinical and inflammatory variables. The changes observed in three miRNAs (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-3p and hsa-miR-16-5p) significantly correlated with the changes observed in clinical parameters (that is, DAS28), and five of them at least with changes in inflammatory parameters such as CRP or ESR (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-126-3p and hsa-miR-23-3p) (Figure 4). A direct and significant relationship was also demonstrated among all the miRNAs (data not shown). In parallel, as described above, IPA analysis showed specific networks

Table 3 Potential genes directly related to rheumatoid arthritis that constitute direct targets of the validated miRNAs

miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
Role of macrophages, fibroblasts and endothelial cells in rheumatoid arthritis						
--	APC	APC	--	--	--	Adenomatous polyposis coli
--	--	--	--	CCND1	CCND1	Cyclin D1
CHUK	CHUK	--	--	CHUK	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
--	FGF2	--	--	FGF2	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
--	FZD4	--	--	FZD4	FZD4	Frizzled class receptor 4
IL36B	--	--	--	--	IL36B	Interleukin 36, beta
IL-36RN	--	--	--	--	IL36RN	Interleukin 36 receptor antagonist
--	--	IL6R	--	IL6R	--	Interleukin 6 receptor
--	IL6ST	--	--	IL6ST	--	Interleukin 6 signal transducer
IRAK2	--	--	--	--	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
--	--	--	LRP6	--	LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
--	PIK3C2A	--	--	PI3KC2A	--	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
--	--	PI3KCD	PI3KCD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
PRKCE	PRKCE	--	--	PRKCE	--	Protein kinase C, epsilon
Role of osteoblasts, osteoclasts and chondrocytes in rheumatoid arthritis						
miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
--	--	--	--	ADAMTS5	ADAMTS5	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5
--	APC	APC	--	--	--	Adenomatous polyposis coli
--	--	BCL2	--	BCL2	BCL2	B-cell LL/lymphoma 2
--	--	BMPR2	--	BMPR2	--	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
CHUK	CHUK	--	--	CHUK	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
--	FOXO1	--	--	--	FOXO1	Forkhead box 01
--	FZD4	--	--	FZD4	FZD4	Frizzled class receptor 4
IL1F10	--	IL1F10	--	--	--	Interleukin 1 family, member 10 (theta)
IL36B	--	--	--	--	IL36B	Interleukin 36, beta
IL36RN	--	--	--	--	IL36RN	Interleukin 36 receptor antagonist
--	--	--	LRP6	--	LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
--	PIK3C2A	--	--	PI3KC2A	--	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
--	--	PI3KCD	PI3KCD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
XIAP	XIAP	--	--	--	--	X-linked inhibitor of apoptosis
Role of IL-17A in arthritis						
miR-146	miR-223	miR-125b	miR-126	miR-23	miR-16	Entrez Gene NaME
PIK3CD	--	--	PIK3CD	--	--	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta

Only those genes regulated by at least two of the validated miRNAs are included in the table. miRNA, microRNA; IL-17A, interleukin 17A.

demonstrating interrelations among their targets directly associated to RA disease.

Serum miRNAs hsa-miR-23a-3p and hsa-miR-223-3p as predictors of therapy response in RA patients

As a general feature, we found that the better the status of the patient before the treatment (in terms of clinical and serological parameters) the lowest changes in DAS

and levels of miRNAs were found after anti-TNF α /DMARDs combination therapy. In particular, elevated levels of miRNAs before starting the therapy were indicative of no response (Figure 5A).

That data were further supported by ROC analyses, which showed that hsa-miR-23-3p and hsa-miR-223-3p levels at T1, with a cutoff value of 6.9 and 11.2 (relative expression at T1) respectively, were predictors of non-

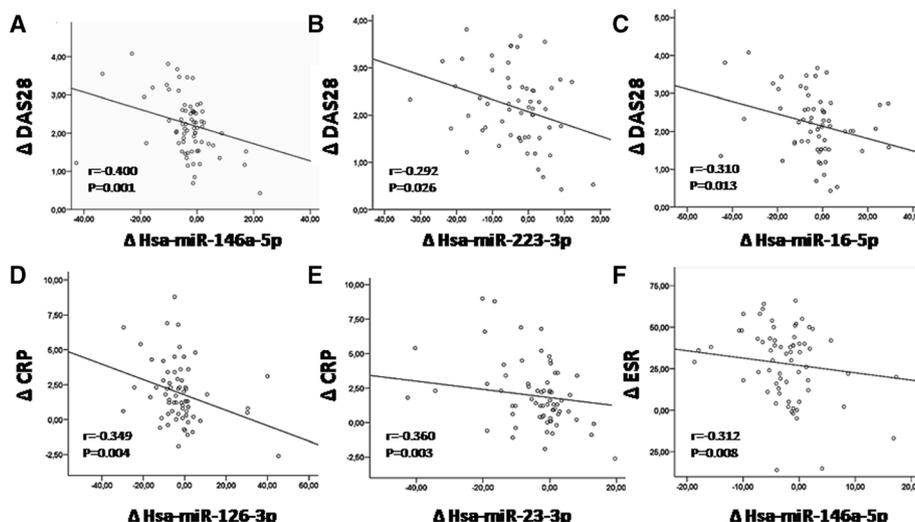


Figure 4 Changes in serum miRNAs correlate with changes in clinical variables in RA patients. Changes after anti-TNFα/DMARDs combination therapy (T1-T2) of various miRNAs significantly correlated with the changes in DAS28 (A-C), in CRP (D-E) and in ESR (F). r values of Spearman's rank correlation and P values of their null hypothesis are shown. CRP, C-reactive protein; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; ESR, erythrocyte sedimentation rate; miRNAs, microRNAs; RA, rheumatoid arthritis; T1, baseline; T2, at 6 months; TNFα, tumor necrosis factor alpha.

response to anti-TNFα/DMARD combination treatment (Figure 5B-C) with a sensitivity of 62.5% and 57.1%, and a specificity of 86.4% and 90.2% respectively. The analysis of changes in relative expression of miRNAs after treatment further showed a downregulation instead of

upregulation in RA patients non-responders, while in responders, a significant increase in three of the miRNAs validated was demonstrated (Figure 6A).

To evaluate their relevance as biomarkers in response to anti-TNFα/DMARDs combination therapy, we conducted

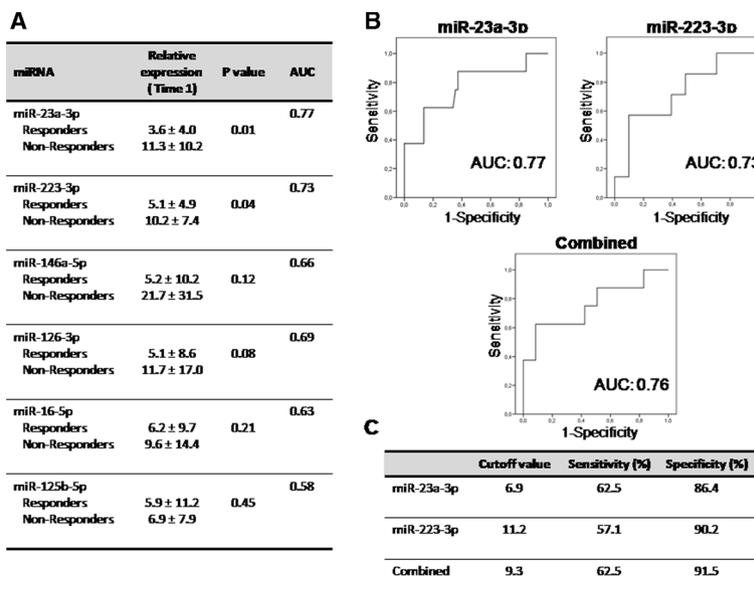


Figure 5 Evaluation of candidate miRNAs as predictors of response to therapy. (A) Relative expression levels of the six miRNAs validated in plasma of RA patients (n = 95) before starting the anti-TNFα/DMARDs combination therapy (T1). Data are shown as mean ± standard deviation. Area under the curve (AUC) was calculated after plotting the receiver operating characteristic (ROC) curve. (B) ROC curve analyses of miR-23a-3p (left panel) and miR-223-3p (right panel), which showed the highest values for AUC; below is shown the combined panel for the two miRNAs that performed as described in Material and methods. (C) Sensitivity and specificity of each miRNA test. Cutoff value with higher specificity was selected. DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; miRNAs, microRNAs; RA, rheumatoid arthritis; T1, baseline; TNFα, tumor necrosis factor alpha.

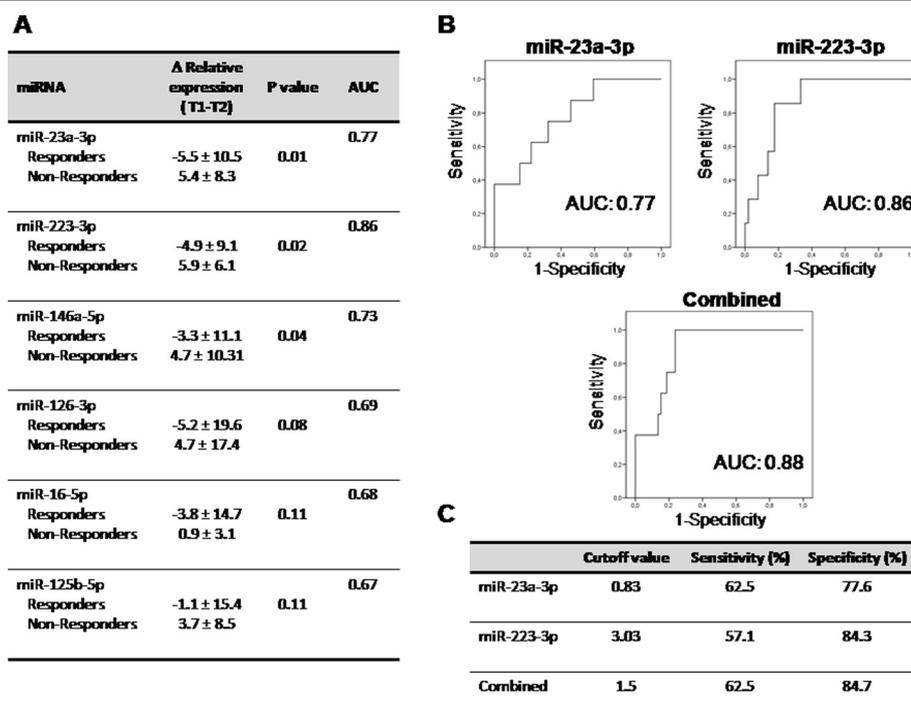


Figure 6 Evaluation of candidate miRNAs as potential biomarkers of response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy. (A) Changes in relative expression levels of the six miRNAs validated in plasma of RA patients (n = 95) before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy (T1-T2). Data are shown as mean \pm standard deviation. Area under the curve (AUC) was calculated after plotting the receiver operating characteristic (ROC) curve. (B) ROC curve analyses of miR-23a-3p (left panel) and miR-223-3p (right panel), which showed the highest values for AUC; below is shown the combined panel for the two miRNAs performed as described in Material and methods. (C) Sensitivity and specificity of each miRNA test. Cutoff value with higher specificity was selected. DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; miRNAs, microRNAs; RA, rheumatoid arthritis; T1, baseline; T2, at 6 months; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

a ROC analysis of that miRNAs. ROC analysis showed the highest AUC for miR-23 and miR-223. Changed relative expression between T1 and T2 for miR-23, at a cutoff value of 0.83, demonstrated a sensitivity of 62.5% and a specificity of 77.6%. At a cutoff value of 3.03 for miR-223, the values were 57.1% and 84.3% respectively (Figure 6A-C).

To improve accuracy of the analysis, we performed the combination of ROC curve analyses of miR-23, and miR-223. The ratio of combination for these miRNAs at T1 demonstrated an increase in both the sensitivity (62.5%) and specificity (91.5%) in relation to those given by each miRNA alone (Figure 6B-C). The ratio of combination for the change of these miRNAs (T1-T2) also yielded the highest AUC value of 0.88 and at the optimal cutoff value of 1.5, the sensitivity and specificity were 62.5% and 84.7%, (Figure 6B-C).

Taken together, these results suggest that serum hsa-miR-23a-3p and hsa-miR-223-3p can act both as predictors of therapy response and biomarkers of response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy with high specificity.

Discussion

MicroRNAs are emerging as potential targets for new therapeutic strategies of autoimmune disorders. In the present study, data on miRNA serum levels of RA patients before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy, and their close relationship with the improvement of the disease, suggest their potential use as novel biomarkers for monitoring therapy outcome.

Almost all of the RA patients showed complete clinical response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy, not only in disease activity (swollen joints, painful pain scales, DAS28, and so on), but also in physical function, quality of life, fatigue, and sleep (HAQ). These results validate previous studies [20,21].

Most of the miRNAs evaluated - in the setting of our PCR array - were found increased in response to treatment. Since miRNAs generally act as negative regulators of their target proteins, the increase in the levels of miRNAs could imply a reduction in the expression of all their target proteins, which were altered in their expression in RA patients before the biological therapy. In this regard, the functional classification allowed us to demonstrate

that the majority of altered miRNAs had as potential target molecules/proteins/transcription factors involved in inflammation and autoimmunity processes, activation of T and B cells, musculoskeletal dysfunction or cardiovascular disease. Therefore, the increase in the levels of those miRNAs after anti-TNF α /DMARDs combination therapy might be associated to a reduction in the inflammatory profile and the improvement of the overall disease status of patients. In support for this hypothesis, we further found a significant reduction in the serum levels of inflammatory and autoimmunity markers.

The proteolytic degradation of extracellular matrix (ECM) molecules in articular cartilage in the joint is a crucial catabolic event in RA [22]. Synoviocytes and synovial macrophages produce inflammatory mediators including prostaglandins, reactive oxygen species and proinflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6 and TNF α) that stimulate articular chondrocytes to produce matrix-degrading enzymes such as matrix metalloproteinases, leading to the destruction and degeneration of the cartilage ECM [23]. Thus, a putative effect on the reduction of chondrocyte maturation (as identified in the cluster of miRNAs found increased after therapy), might have beneficial effects on the prevention of the articular damage in RA patients.

The miRNAs validated by RT-PCR in our cohort of patients (miR146a-5p, miR-16-5p, miR-23-3p, miR-125b-5p, miR223-3p; miR126-3p) have been previously reported to act as relevant regulators of immune cells development, playing crucial roles in the inflammatory response, and acting as key players in the pathogenesis of various chronic and autoimmune disorders, including RA itself [24].

It is also interesting to note that in this study we found that several genes were the targets of more than one of the verified miRNAs (Table 3). For example, the gene that codifies for CHUK may be potentially regulated by four out of the six miRNAs. CHUK (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase, also known as inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (IKK- α), or IKK1) is a protein kinase that mediates IkappaB phosphorylation and nuclear factor kappa B (NFkB) activation [25]. Almost all of the proinflammatory factors involved in the pathogenesis and progression of RA (that is, IL-6 or TNF α) are regulated by the transcription factor NFkB. Thus, drugs that modulate the activation and function of CHUK are likely to have therapeutic value in inflammatory disease such as RA.

Other genes directly related to RA were also found to be multiple targets for these miRNAs, including IL6 receptor alpha (IL6R) and beta (IL6ST) chains, FGF-2, a number of intracellular molecules, and the BMPR2. Current studies showed that, in addition to their role in enhancing autoantibody production, IL-6 promotes

synovial tissue inflammation and osteoclastogenesis, leading to the severe synovitis with pannus formation and the progressive cartilage and bone destruction in multiple joints found in RA [26]. Moreover, IL-6 is an important contributor to the development of cardiovascular disease (CVD) in RA patients [27]. In our cohort, IL-6 receptors alpha and beta were found to be putative targets for three of the six validated miRNAs (hsa-miR-23-3p, hsa-miR-125b-5p, and hsa-miR223-3p). In parallel, plasma analysis showed that anti-TNF drugs promoted a significant reduction on IL-6 levels, thus suggesting a role for those miRNAs in the regulation of IL-6 production.

A direct target for three of the validated miRNAs found altered in RA patients after anti-TNF/DMARDs therapy was the FGF-2. In the synovial fluid FGF2 plays a role in the final step of osteoclastic bone resorption in RA joint destruction that is preceded by recruitment and differentiation of osteoclasts by other factors. Thus, endogenous FGF2 might participate in the pathogenesis of that bone resorptive disease through its direct action on osteoclasts [28].

From a molecular point of view, the severity and prognosis of RA are dependent on the balance between inflammatory or destructive pathways and homeostatic or repair pathways [29]. In that way, class I phosphoinositide 3 kinase (PI3K) δ is a promising therapeutic target for RA. PI3K δ is highly expressed in RA synovium, especially in the synovial lining. Its expression is selectively induced by the inflammatory cytokines TNF and IL-1. It has been demonstrated that PI3K δ is a major regulator of platelet-derived growth factor (PDGF)-mediated fibroblast growth and survival via Akt [30]. Thus, targeting PI3K δ in RA could modulate synoviocyte function via anti-inflammatory and disease-altering mechanisms. Furthermore, the family of PI3Ks plays an important role in the pathogenesis of CVD by modulating several essential biologic processes, such as metabolism, vascular homeostasis and thrombogenicity [31]. In fact, various observations indicate that pharmacological inhibition of PI3Ks may be a new therapeutic strategy for preventing cardiovascular complications in this autoimmune disease.

Increasing evidence suggests a role for bone morphogenetic protein (BMP) signaling in joint homeostasis and disease. BMP signaling, induced through the binding of a dimeric BMP ligand to type I and type II BMP receptors, has a key role in the pathogenesis of RA [32]. Moreover, it has been shown that BMP expression can be regulated by anti-TNF α drugs [33], thus supporting a relevant role for the miRNAs involved in the response to treatment and having that receptor as a target.

Consistent with our results, a recent study has shown the association of two of the miRNAs found significantly increased in response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy in our study (hsa-miR-223-3p, and hsa-

miR-16-5p) with disease activity in RA patients newly diagnosed [34]. Furthermore, three trials in 2008 indicated the existence of altered expression of some of those miRNAs (hsa-miR-16-3p, hsa-miR-132, hsa-miR-146a-5p and hsa-miR-155-3p) in leukocytes of arthritic patients [35]. A more recent study showed that decreased expression of hsa-miR-146a and hsa-miR-155-3p contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with RA [36]. In support for that previously reported data, correlation studies in our cohort demonstrated, first, the existence of a significant relationship among all the validated miRNAs. Moreover, all of them have putative targets directly associated to RA disease and involved in the response to anti-TNF α drugs.

Second, we found a negative correlation between the changes in the expression levels of almost all the validated miRNAs and the changes occurred in various clinical and inflammatory parameters. Furthermore, ROC analyses demonstrated that two of these six miRNAs (hsa-miR-23-3p and hsa-miR-223-3p) can act in RA patients as both predictors of therapy response (indicating those patients who would not benefit from anti-TNF α /DMARDs combination therapy), and as biomarkers of response to anti-TNF α /DMARDs combination therapy (so that their levels would be indicative of treatment efficacy and also of the degree of response).

Our data contrast with a recent study performed in patients with psoriasis treated with the TNF α -inhibitor etanercept [37]. In that cohort of patients, etanercept significantly downregulated serum levels of hsa-miR-223-3p and hsa-miR-126-5p among others. In addition, those miRNAs were not related to disease severity in psoriasis. Those results suggest a distinctive involvement of similar miRNAs in pathways affected by anti-TNF α /DMARDs combination therapy depending on the inflammatory disease concerned.

Conclusions

Altogether, our data suggest that differentially expressed miRNAs in the serum of RA patients before and after anti-TNF α /DMARDs combination therapy have potential to serve as novel biomarkers for predicting and monitoring therapy outcome.

Since we did not perform a complete plasma human microarray analysis, we cannot exclude the complementary role of other circulating miRNAs in the response to treatment, and because of the clinical heterogeneity of RA patients, our data must be confirmed in larger studies. Moreover, specific studies on the mechanisms underlying the altered expression of those miRNAs after anti-TNF α /DMARDs combination therapy, as well as the identification of the mechanism and cellular sources of those extracellular miRNAs are still required.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Changes operated on clinical and serological parameters after anti-TNF α /DMARDs combination therapy.

Table S2. Comparative analysis among groups of treatment. Validation cohort.

Table S3. Changes operated on validated miRNAs after anti-TNF α /DMARDs combination therapy. **Table S4.** Comparative analysis among groups of treatment. **Table S5.** Individual patient's treatment.

Additional file 2: Figure S4. Relative miRNA levels at starting (T1) and after six months of anti-TNF α /DMARDs combination therapy (T2) in the validation cohort (n = 85). To validate the PCR array data, 10 miRNAs differentially expressed were selected (hsa-miR-125b, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-124a-3p, hsa-miR-155-5p, and hsa-miR-223). (A) Relative expression levels of each miRNA in the group of RA patients responders to therapy (n = 75). Boxes indicate the interval between the 25th and 75th percentiles and horizontal bars inside boxes indicate median. Whiskers indicate the interval of data within 1.5 \times interquartile ranges (IQR). Closed circles indicate data points outside 1.5 \times IQR. *P < 0.05. (B) Relative expression levels of each miRNA in the group of non-responders to the combination therapy (n = 10).

Additional file 3: Figure S1. Distribution of all the genes potentially modified by the validated miRNAs integrated in the pathways related to the role of macrophages, fibroblasts and endothelial cells in rheumatoid arthritis. The different points were RA-related canonical pathways might be regulated are represented by grey-filled symbols.

Additional file 4: Figure S2. Distribution of all the genes potentially modified by the validated miRNAs integrated in the pathways related to the role of osteoblasts, osteoclasts, and chondrocytes in rheumatoid arthritis. The different points were RA-related canonical pathways might be regulated are represented by grey-filled symbols.

Additional file 5: Figure S3. Distribution of all the genes potentially modified by the validated miRNAs integrated in the pathways related to the role of IL-17A in rheumatoid arthritis. The different points were RA-related canonical pathways might be regulated are represented by grey-filled symbols.

Abbreviations

ADA: adalimumab; ADAMTSS: ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5; anti-CCPs: anti-cyclic citrullinated peptides; APC: adenomatous polyposis coli; AUCs: areas under the curve; BCL1: B-cell CLL/Lymphoma 2; BMP: bone morphogenetic protein; BMPRII: bone morphogenetic protein receptor type II; CCND1: cyclin D1; CHUK: conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase; CRP: C-reactive protein; CVD: cardiovascular disease; DAS28: disease activity score; DMARDs: disease-modifying antirheumatic drugs; ECM: extracellular matrix; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ESR: erythrocyte sedimentation rate; ETA: etanercept; FGF2: fibroblast growth factor 2; FOXO1: forkhead box O1; FZD4: frizzled class receptor 4; HAQ: health assessment questionnaire; HCQ: hydroxychloroquine; IFX: infliximab; IKK α : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha; IL: interleukin; IL6R: IL-6 receptor; IL6ST: IL-6 signal transducer; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; IRAK2: interleukin-1 receptor-associated kinase 2; LRP6: low-density lipoprotein receptor-related protein 6; MCP-1: monocyte chemoattractant protein; miRNAs: microRNAs; mRNA: messenger RNA; miRTC: miRNA reverse transcription control assay; NF κ B: nuclear factor kappa B; NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs; PDGF: platelet-derived growth factor; PIK3C2A: phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha; PIK3CD: phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta; PPC: positive PCR control; PRKCE: protein kinase C, epsilon; RA: rheumatoid arthritis; RF: rheumatoid factor; ROC curve: receiver operating characteristic curve; SD: standard deviation; SDAI: simple disease activity index; SJC: swollen joint count; sTNFRII: soluble TNF receptor II; T1: baseline; T2: at 6 months; Th-17: T helper 17; TJC: tender joint count; TNF α : tumor necrosis factor type alpha; VAS: visual analog scale of pain; VEGF: vascular endothelial growth factor; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CP-S, PR-L, MV, and JRP developed the *in vivo* assays, performed the experiments, solved technical problems and drafted the manuscript. MAA, CC-V, PF, and IF followed up with patients, revised the manuscript, and contributed useful discussion. ARA, CM, RG-C, NB, and CL-P formed the hypothesis, directed and coordinated the project, designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. EC-E and AE performed clinical analysis, revised the manuscript, and contributed useful suggestions. YJG performed statistical analysis, helped to draft the manuscript, and discussed the results. All authors read and approved the manuscript.

Authors' information

Carmen Castro-Villegas and Carlos Pérez-Sánchez shared first authorship. Nuria Barbarroja and Chary López-Pedreira shared last authorship.

Acknowledgements

We thank all patients and healthy subjects for their participation in the study. We thank Ms Rosario Carretero for her excellent technical support. This work was supported by grants from the 'Junta de Andalucía' (CTS-7940), the Ministry of Health co-financed with FEDER funds (PI11/00566 and PI12/01511) and the Spanish Foundation of Rheumatology. CL-P was supported by a contract from the Spanish Junta de Andalucía.

Author details

¹Maimonides Institute for Research in Biomedicine of Cordoba (IMIBIC)/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Avenida Menendez Pidal S-N, E-14004 Cordoba, Spain. ²Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Str. Emil Isac Nr. 13, 400023 Cluj-Napoca, Romania. ³Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine of Ciudad Real, University of Castilla-La Mancha, Calle Altagracia, 50, 13003 Ciudad Real, Spain. ⁴Regional Centre for Blood Donation, University of Murcia, IMIB-Arrixaca, Campus Espinardo, E-30100 Murcia, Spain.

Received: 7 August 2014 Accepted: 13 February 2015

Published online: 09 March 2015

References

- Filková M, Jünger A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*. 2012;26:131–41.
- Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Anti-cytokine antibodies for rheumatic diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10:1204–11.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344:907–16.
- 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:S1.
- Prajapati R, Plant D, Barton A. Genetic and genomic predictors of anti-TNF response. *Pharmacogenomics*. 2011;12:1571–85.
- Plenge RM, Criswell LA. Genetic variants that predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis: current challenges and future directions. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:145–52.
- Krintel SB, Grunert VP, Hetland ML, Johansen JS, Rothfuss M, Palermo G, et al. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52:1245–53.
- Ortea I, Roschitzki B, Ovalles JG, Longo JL, de la Torre I, González I, et al. Discovery of serum proteomic biomarkers for prediction of response to infliximab (a monoclonal anti-TNF antibody) treatment in rheumatoid arthritis: an exploratory analysis. *J Proteomics*. 2012;77:372–82.
- Bottini N, Firestein GS. Epigenetics in rheumatoid arthritis: a primer for rheumatologists. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15:372.
- Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:229.
- Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R101.
- Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:209.
- Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1001–9.
- Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1294–304.
- Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:1582–90.
- Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R86.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham 3rd CO, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;2010:2569–81.
- Chen JS, Makovey J, Lassere M, Buchbinder R, March LM. Comparative effectiveness of anti-tumour necrosis factor (TNF) drugs on health-related quality of life among patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66:464–72.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26:509–15.
- Flouri I, Markatseli TE, Voulgari PV, Boki KA, Papadopoulos I, Settas L, et al. Comparative effectiveness and survival of infliximab, adalimumab, and etanercept for rheumatoid arthritis patients in the Hellenic Registry of Biologics: low rates of remission and 5-year drug survival. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;43:447–57.
- Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:224.
- Csaki C, Mobasher A, Shakibaei M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R165.
- Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*. 2012;160:198–206.
- Luo X, Ranade K, Talker R, Jallal B, Shen N, Yao Y. microRNA-mediated regulation of innate immune response in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:210.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*. 1997;278:860–6.
- Ohtsuiji M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuiji N, Okazaki H, Tsurui H, et al. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel FcγRIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. *Mod Rheumatol*. 2015;25:270–7.
- Panoulas VF, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Smith JP, Milionis HJ, Douglas KM, et al. Association of interleukin-6 (IL-6)-174G/C gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: the role of obesity and smoking. *Atherosclerosis*. 2009;204:178–83.
- Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *J Biol Chem*. 2000;275:31444–50.
- Luyten FP, Lories RJ, Verschueren P, de Vlam K, Westhovens R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20:829–48.
- Bartok B, Boyle DL, Liu Y, Ren P, Ball ST, Bugbee WD, et al. PI3 kinase δ is a key regulator of synoviocyte function in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 2012;180:1906–16.
- Eisenreich A, Rauch U. PI3K inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther*. 2011;29:29–36.
- Lories RJ, Daans M, Derese I, Matthys P, Kasran A, Tylzanowski P, et al. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1736–46.
- Korkosz M, Gąsowski J, Leszczyński P, Pawlak-Buś K, Jeka S, Siedlar M, et al. Effect of tumour necrosis factor- α inhibitor on serum level of dickkopf-1

- protein and bone morphogenetic protein-7 in ankylosing spondylitis patients with high disease activity. *Scand J Rheumatol.* 2014;43:43–8.
34. Filková M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1898–904.
 35. Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:226–39.
 36. Zhou Q, Haupt S, Kreuzer JT, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, et al. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014; doi:10.1136/annrheumdis-2013-204377. [Epub ahead of print].
 37. Pivarcsi A, Meisgen F, Xu N, Stähle M, Sonkoly E. Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- α therapy. *Br J Dermatol.* 2013;169:563–70.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Reumatología clínica

www.reumatologiaclinica.org



PÓSTERS EXHIBIDOS

40.º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología

Santiago de Compostela, 21-23 de mayo de 2014

1.ª Sesión

Miércoles, 21 de mayo de 2014

1. SÍNDROMES REUMÁTICOS COMO PRIMERA MANIFESTACIÓN DE UN TUMOR NO CONOCIDO

M.A. Ramírez Huaranga, R. Arenal López, J. Anino Fernández, A. Ariza Hernández, J.L. Cuadra Díaz, M.D. Mínguez Sánchez, M. Paulino Huertas, E. Revuelta Evrard, V. Salas Manzanedo y A. Sánchez Trenado

Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario de Ciudad Real. Ciudad Real.

Introducción: Una gran variedad de manifestaciones reumáticas han sido asociadas con las neoplasias. Las manifestaciones musculoesqueléticas se pueden deber a invasión tumoral directa de los huesos, articulaciones y tejidos blandos pero también pueden aparecer por efecto a distancia del tumor, mediados por factores humorales (síndromes paraneoplásicos). Por lo que las manifestaciones van a depender del órgano comprometido, de las hormonas o péptidos sintetizados por estos, de su asociación con algunas enfermedades del tejido conectivo y aún de su tipo histológico.

Objetivos: Describir las diferentes características de los pacientes ingresados por un cuadro reumático como forma de presentación de un tumor oculto atendidos en el Hospital General Universitario de Ciudad Real (HGUCR).

Métodos: Realizamos un estudio observacional retrospectivo de todos los pacientes ingresados en el servicio de Reumatología del HGUCR durante el periodo enero 2007- mayo 2013, obteniendo un total de 500 pacientes. Posteriormente se procedió a la revisión de los informes clínicos para la obtención de los datos epidemiológicos, clínicos, analíticos, imagenológicos, histológicos, tratamientos recibidos así como la situación actual de dichos pacientes. Con la información obtenida se generó una base de datos en Excel 2007 y el posterior análisis estadístico y de frecuencias mediante el programa STATA.

Resultados: Obtuvimos un total de 28 pacientes; de ellos un 53,57% (15/28) ingresó para estudio y tratamiento de dolor axial, siendo el 50% de características mixtas. En cuanto a las pruebas de imágenes, la radiografía mostró ser una prueba básica para detectar lesiones sugestivas de malignidad. La gammagrafía ósea fue patológica en un 72,22% (13/18), la tomografía en un 91,3% (21/23), resonancia magnética en un 93,75% (15/16) y el PET-TAC en un 83,33% (5/6). Se determinó el foco primario en un 82,14% (23/28); 5 mieloma múlti-

ple, 4 neoplasias de pulmón, 3 de mama, 3 de colon, 3 de próstata entre otros.

Conclusiones: El espectro de síndromes reumáticos asociados con procesos neoplásico comprende más de 30 entidades; un grupo importante lo constituye los originados por lesiones óseas de tipo metastásico. Los factores de riesgo más asociados son la edad, la presencia de antecedentes oncológicos y la presencia de hábitos o fármacos nocivos. En nuestra serie el dolor lumbar de origen metastásico fue la etiología más frecuente. Dado que esta es una sintomatología muy habitual y un problema de salud importante con una prevalencia del 70% en la población general, su correcta evaluación permitirá descartar otras etiologías que conlleven un tratamiento y pronóstico distinto. La presencia de anemia ($Hb < 12$ mg/dl) presentó un riesgo de 2,8 de morir ($p = 0,259$, IC95% 0,46 a 17,02). La presencia de alteración en los marcadores tumorales incrementa en 7,65 las chances de morir ($p = 0,022$, IC95% 1,34 a 43,43). Las variables VSG y PCR no presentaron asociación estadísticamente significativa con la evolución. Si bien una búsqueda extensa de neoplasia oculta dentro de la evaluación inicial de un paciente con manifestaciones reumáticas no se considera costo-eficiente, se recomienda realizarlo en los casos en los que exista una presentación atípica, signos de alarma o tengan algún hallazgo específico en las pruebas complementarias iniciales que sugieran malignidad.

2. FRACTURAS VERTEBRALES OSTEOPORÓTICAS Y SU IMPACTO ECONÓMICO EN EL PACIENTE GERIÁTRICO

M.A. Ramírez Huaranga, C. Parraga Prieto, R. Arenal Lopez, J. Anino Fernández, A. Ariza Hernández, J.L. Cuadra Díaz, M.D. Mínguez Sánchez, M. Paulino Huertas, E. Revuelta Evrard, V. Salas Manzanedo y A. Sánchez Trenado

Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario de Ciudad Real. Ciudad Real.

Introducción: La prevalencia de osteopenia y osteoporosis densitométrica en las personas mayores de 65 años es aproximadamente del 39,4% y 40% respectivamente, llegando a ser del 70% en las personas mayores de 80 años. La incidencia de fractura en esta población se encuentra aumentada de forma significativa, llegando a ser de un 60% en los mayores de 80 años, lo que genera un impacto negativo sobre diversos aspectos relacionados con el sistema sanitario y con la calidad de vida de los pacientes.

Objetivos: Describir las diferentes estrategias farmacológicas y su impacto económico en el abordaje de la fractura vertebral osteopo-

cionadas con la AR, incluyendo los principales eventos adversos del tratamiento de la AR, y promover la salud (general y músculoesquelética); 4) asegurar un enfoque de atención integral para los pacientes con AR con alguna comorbilidad, tales como los modelos de atención de salud para pacientes crónicos, unidades de artritis precoz, relaciones con atención primaria, atención de enfermería especializada y autogestión.

Tabla Póster 147

No.	Se recomienda...	Acuerdo medio/10
1	...investigar comorbilidades y factores de riesgo de alta incidencia o mortalidad, especialmente aquellos que sean potencialmente evitables o que puedan interferir con la evaluación de la AR o su tratamiento.	9,4
2	...la optimización del uso de la anamnesis, el examen físico y la información electrónica como principales fuentes para identificar y confirmar la comorbilidad de la AR.	9,3
3	...que se registren cuidadosamente todos los fármacos que el paciente toma, tengan o no que ver con su AR.	9,4
4	...un control más estrecho de la enfermedad en presencia de manifestaciones extra-articulares, de acuerdo a lo recomendado en las principales guías clínicas.	9,2
5	...que se apliquen, cuando sean necesarias y sin demora, las medidas preventivas de osteoporosis y fracturas en los pacientes con AR y elevado riesgo de fracturas.	9,2
6	...tener especial cuidado en la valoración del dolor crónico y la depresión, por ejemplo descartando la existencia de fibromialgia asociada, cuando se evalúa y se decide un tratamiento en pacientes con AR.	8,4
7	...implicar al reumatólogo en todas las fases de la planificación y toma de decisiones de la cirugía (ortopédica o general) en pacientes con AR.	8,6
8	...definir en cada área de salud el nivel de responsabilidad en el manejo de la comorbilidad específica, adaptándose en cada caso al entorno y recursos disponibles, de acuerdo a las guías nacionales e internacionales para su manejo.	9,0
9	...que se realice de forma rutinaria promoción de la salud en pacientes con AR.	8,9
10	...que se incida sobre el mantenimiento de la higiene oral y que se sigan pautas de prevención en caso de una extracción dental o cirugía oral en los pacientes con AR.	8,7
11	...el seguimiento de las recomendaciones de guías y consensos sobre la gestión del riesgo con el uso de fármacos antireumáticos, especialmente FAME sintéticos y biológicos, glucocorticoides y AINES.	9,6
12	...informar, y aconsejar cuando proceda, sobre el efecto de la AR y sus tratamientos en el embarazo y la fertilidad.	9,8
13	...informar y fomentar la educación sexual del paciente con AR y de su pareja, especialmente en los temas relacionados con su enfermedad.	7,9
14	...una valoración periódica individualizada del paciente polimedcado con AR, sopesando los beneficios y riesgos de cada fármaco en cada momento de la evolución.	9,1
15	...que se incluya el manejo de estos pacientes específicamente en los programas de formación de reumatología, sesiones clínicas y de investigación.	8,9
16	...que, en los pacientes con AR y multimorbilidad el reumatólogo debe ser el coordinador principal de la atención, integral, con independencia de la participación y responsabilidad de otros profesionales de la salud (o especialistas médicos).	8,8
17	...que, en los pacientes con AR y multimorbilidad, se realice un diagnóstico y tratamiento precoz de la comorbilidad, así como una estandarización de su seguimiento.	9,0
18	...que, en los pacientes con AR y multimorbilidad, se establezca una buena comunicación, colaboración y coordinación entre las unidades de reumatología y otros profesionales y/o proveedores de salud en el mismo u otros niveles asistenciales	9,5
19	...la participación o necesidad de la enfermería especializada en unidades de reumatología.	9,1
20	...que se documenten de forma sistemática los resultados de salud en el paciente con AR.	8,7
21	...que se comprometa e involucre a los reumatólogos en el desarrollo de modelos de atención al paciente crónico.	9,2

148. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICRORNAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INFILIXIMAB

N. Barbarroja¹, C. Castro¹, C. Pérez-Sánchez¹, P. Ruiz-Limón¹, M.A. Aguirre¹, A. Escudero¹, Y. Jiménez-Gómez¹, R.M. Carretero-Prieto¹, P. Font¹, E. Collantes-Estévez¹, R. González-Conejero², C. Martínez² y C. López-Pedrerá¹

¹Unidad de Investigación y Servicio de Reumatología. IMIBIC/Hospital Reina Sofía. Córdoba. ²Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Murcia.

Introducción: El empleo de terapias biológicas como el infliximab (IFX) en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) ha supuesto un gran avance terapéutico. Los microRNAs son moléculas de ARN monocatenario (20-22 nucleótidos), no codificantes, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Sus niveles plasmáticos se modifican ante ciertas condiciones patológicas y terapéuticas, por lo que podrían constituir biomarcadores diagnósticos o de respuesta al tratamiento.

Objetivos: Evaluar el efecto del tratamiento in vivo con IFX sobre el perfil de expresión de microRNAs en el suero de pacientes con AR, así como la posible asociación entre la expresión alterada de dichos microRNAs y los cambios ocurridos en diversos parámetros clínicos y serológicos.

Métodos: Se evaluaron muestras de 34 pacientes AR antes y después del tratamiento con IFX (3 mg/kg en infusión intravenosa, administración a 0, 2 y 6 semanas, y posteriormente cada 8 semanas durante 6 meses). A todos se les realizó una evaluación clínica [toma de fármacos modificadores de la enfermedad (FAME), nº articulaciones inflamadas y dolorosas, (TJC y SJC), escala visual analógica (VASp y VASdr), actividad de la enfermedad (DAS-28 y SDAI), y capacidad funcional (HAQ)] y serológica [niveles de factor reumatoide (FR), anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (ACCP), velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva (PCR), IL-6, receptor de TNF (TNF-R), MCP-1 y VEGF] en ambos tiempos. El perfil de expresión de miRNAs se determinó mediante un array de PCR a partir de ARN total de un pool de suero de 10 pacientes. Los resultados se evaluaron mediante software específico, y se validaron mediante RT-PCR de un set de microRNAs en todos los pacientes incluidos en el estudio. Se realizaron estudios de correlación entre éstos y las distintas variables de evaluación clínica y analítica.

Resultados: Los valores medios de todos los parámetros clínicos evaluados se hallaron significativamente disminuidos tras el tratamiento con IFX. Entre los parámetros serológicos, VSG, PCR, FR e IL-6 se redujeron de forma significativa. Los resultados del array indicaron que el 90,1% de los miRNAs se sobre-expresaban, y en el 9,9% disminuía su expresión tras el tratamiento. La clasificación funcional de los miRNAs sobre expresados demostró que alrededor del 60% de los miRNAs estaban relacionados con enfermedad cardiovascular e inmunopatología, activación de células T y B, inflamación y autoinmunidad. De entre los 10 miRNAs seleccionados para la validación del array, 6 se encontraron significativamente aumentados tras tratamiento con IFX. Los estudios de correlación mostraron múltiples asociaciones negativas entre los miRNAs validados y parámetros clínicos, de autoinmunidad e inflamatorios.

Conclusiones: 1. El tratamiento in vivo con IFX promueve una alteración significativa de la expresión, en el suero de pacientes AR, de un gran número de microRNAs asociados a procesos de inflamación y autoinmunidad, activación de células T y B y enfermedad cardiovascular. 2. Existe una correlación significativa entre la expresión de diversos miRNAs (miR-146-a, miR-125b, miR-126, miR-124a, miR-223 y miR-16) y la respuesta positiva al tratamiento, en términos de marcadores de actividad de la enfermedad, afectación

articular, inflamación y autoinmunidad. Por tanto, dichos miRNAs podrían considerarse potenciales biomarcadores de respuesta al tratamiento con IFX en pacientes con AR.

Financiado por: P08-CVI-04234, PI12/01511, PI-0191-2013, PI11/00566, Sociedad Española de Reumatología.

149. ESTUDIO MEDIANTE ECOCARDIOGRAFÍA DOPPLER EN PACIENTES CON LUPUS ERMATEMATOSO SISTÉMICO

S. Heredia¹, J. Narváez¹, A. Zacarías¹, E. Armengol¹, G. Albert¹, A. Roset², P. Sigüenza², X. Juanola¹, M. Rubio Rivas² y J.M. Nolla¹

Unidad Funcional de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (UFMAS).

¹Servicio de Reumatología; ²Servicio de Medicina Interna.

Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona.

Objetivos: Evaluar la frecuencia de alteraciones ecocardiográficas (excluyendo el derrame pericárdico) en una cohorte de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) e investigar los factores relacionados con las mismas.

Métodos: Fueron objeto de estudio 243 pacientes con LES atendidos entre 1980 y 2013 en un hospital universitario de tercer nivel que no asiste a población pediátrica y registrados en una base de datos específica (registro AQUILES). Se seleccionaron para su análisis 91 pacientes que habían sido estudiados en al menos una ocasión con un ecocardiograma Doppler. En los enfermos con más de una exploración, sólo se incluyó en el análisis los datos referentes a la última. En cada estudio se investigó de forma protocolizada la presencia de disfunción miocárdica sistólica, disfunción miocárdica diastólica, valvulopatía, alteraciones de la motilidad segmentaria sugestivas de cardiopatía isquémica, e hipertensión pulmonar (HTP), definida como una presión arterial pulmonar (PAP) sistólica mayor de 40 mmHg y una velocidad de regurgitación tricuspídea (VRT) superior a 2,5 m/s.

Resultados: La edad media de los pacientes (75 mujeres) fue de 50 ± 12 años (rango, 27-77) y la mediana del tiempo de evolución de la enfermedad en el momento del estudio ecocardiográfico era de 83 meses (rango, 12-156). Los principales hallazgos objetivados fueron: a) Disfunción sistólica en el 1,1% (1/91) de los enfermos. b) Disfunción diastólica en el 5,5% (5/91) de los pacientes; todos presentaban HTA y dos de ellos anticuerpos antifosfolípidos (aFl) positivos. c) Alteraciones de la motilidad segmentaria sugestivas de cardiopatía isquémica: 3,3% (3/91) de los enfermos. d) Valvulopatía subclínica: 46,2% (42/91) de los pacientes, incluyendo 27 casos de insuficiencia tricuspídea (30%), 26 casos de insuficiencia mitral (29%), 5 casos de insuficiencia aórtica (5,5%), 4 casos de estenosis aórtica (4,4%) y 1 caso de endocarditis verrugosa de Libman-Sacks en válvula mitral (1,1%). En algunos pacientes coexistían diferentes tipos de lesión y en todos la disfunción valvular fue leve e) HTP: 7,7% (7/91) de los enfermos. El valor medio de la PAP fue de 46,8 ± 4 mmHg (rango, 40-56) y el valor medio de la VRT de 3 ± 0,3 m/s (rango, 2,7-3,4). Se objetivó dilatación de cavidades derechas en 2 pacientes; ninguno presentó dilatación de vena cava inferior, ni derrame pericárdico. El 86% (6/7) de los pacientes con HTP tenían también algún tipo de valvulopatía. De los pacientes con valvulopatía subclínica, un 40,5% (17/42) presentaban positividad para uno o más de los aFl (Ac anticardiolipina IgG o IgM, Ac anti-beta2-glicoproteína IgG o IgM, anticoagulante lúpico). En los pacientes con HTP, el porcentaje de positividad de los aFl fue del 71,4% (5/7). En el estudio comparativo con 49 controles con LES sin valvulopatía ni HTP, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la positividad de los aFl (positivos en el 45% de los controles; p > 0,05). Tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia de fenómeno de Raynaud entre pacientes con HTP y los controles.

Conclusiones: El estudio con ecocardiografía Doppler en pacientes con LES permite identificar un porcentaje considerable de altera-

ciones cardíacas subclínicas, destacando por su frecuencia la valvulopatía (46%). La prevalencia puntual de HTP definida según parámetros ecocardiográficos en nuestra cohorte fue del 7,7%. Los aFl podrían estar implicados en la patogenia de ambas complicaciones.

150. BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y NEOFORMACIÓN ÓSEA EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE: PERFIL DE EXPRESIÓN EN LEUCOCITOS Y ASOCIACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

A. Escudero Contreras, Y. Jiménez-Gómez, T. Cerdo-Raez, P. Ruiz-Limón, C. Pérez-Sánchez, R.M. Carretero-Prieto, N. Barbarroja, P. Font, J. Calvo, C. López-Pedreira y E. Collantes-Estévez

Servicio de Reumatología y Unidad de Investigación.

IMIBIC-Hospital Reina Sofía. Córdoba.

Introducción: La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad articular caracterizada por el desarrollo de inflamación crónica y neoformación ósea. Diversos estudios han demostrado que la inflamación crónica y la osificación en las EA se desarrollan a través de vías moleculares diferentes, pero con probable influencia recíproca.

Objetivos: Analizar diversos biomarcadores de estatus oxidativo, inflamación y neoformación ósea en plasma y distintos subtipos de leucocitos de pacientes con EA y evaluar su interrelación, así como su asociación con la actividad de la enfermedad.

Métodos: Diecisiete pacientes con EA y 25 donantes sanos se incluyeron en el estudio. Los índices de actividad de la enfermedad se analizaron utilizando el 'índice funcional de la EA de Bath' (BASFI) y el 'índice de actividad de la EA de Bath' (BASDAI). Varios parámetros de estrés oxidativo (producción de peróxidos, glutatión intracelular -GSH-, despolarización mitocondrial -JC1-), citoquinas/quimioquinas ((CCL3, TNF α , IL1, IL-6, IL10, IL17, IL23, MCP1, VEGF) y marcadores de recambio óseo y señalización intracelular (i.e. osteocalcina, BMP2, TGF β , ERAP1, WNT3A, y STAT3) se cuantificaron en distintos subtipos de leucocitos (monocitos, linfocitos y neutrófilos) mediante RT-PCR y citometría de flujo.

Resultados: Diversos marcadores, tanto de inflamación como de osteogénesis, se hallaron incrementados en neutrófilos de pacientes EA (i.e. TNF α , IL-6, IL-23, IL-10, VEGF, osteocalcina, BMP2, ERAP1) en relación al grupo control, mientras que los linfocitos sólo mostraron expresión incrementada de citoquinas y quimioquinas inflamatorias (TNF α , IL-6, IL17, MCP1 y TGF β). En monocitos se hallaron reducidos los niveles de moléculas inflamatorias (IL6 y TNF α), junto a un aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL10. Sin embargo, mostraron expresión incrementada de proteínas osteogénicas como la osteocalcina. Los tres tipos celulares mostraron expresión incrementada de moléculas reguladoras de la expresión de dichas proteínas (Wnt3A y STAT3). El estatus oxidativo se halló significativamente alterado en monocitos y neutrófilos (reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial y de los niveles de GSH). Los estudios de correlación mostraron asociación positiva entre distintos marcadores de inflamación y neoformación ósea. También se halló correlación entre diversos marcadores inflamatorios/osteogénicos y el estatus oxidativo, principalmente a nivel de alteración de actividad mitocondrial. STAT3 y Wnt3A se hallaron positivamente correlacionadas con marcadores de inflamación y osteogénesis, sugiriendo que ambas rutas podrían regular de forma paralela los procesos inflamatorios y osteogénico dentro del mismo tipo celular. BASFI y BASDAI correlacionaron principalmente con marcadores de inflamación como TNF α e IL-10.

Conclusiones: 1. Distintos subtipos de leucocitos circulantes en pacientes con EA parecen jugar un papel diferencial en los procesos inflamatorio y osteogénico. 2. El estatus oxidativo, con alteración

OP0186 ANALYSIS OF UVEITIS EVENTS IN THE BIOLOGICS IN PEDIATRIC RHEUMATOLOGY (BIKER)-REGISTRY

G. Horneff¹, I. Foeldvari², K. Minden³, K. Tenbrock⁴, H.I. Huppertz⁵, I. Becker⁶, on behalf of German and Austrian Collaborative BIKER Study Group. ¹Asklepios, Sankt Augustin; ²Hamburger Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie, Hamburg; ³Charité, Berlin; ⁴RWTH Aachen, Aachen; ⁵Prof Hess Childrens Hospital, Bremen; ⁶Institute of Medical Statistics, Informatics and Epidemiology, Cologne, Germany

Background: Uveitis is one of the major extraarticular manifestations of JIA. Open studies demonstrate efficacy of Adalimumab (ADA) and Infliximab. It remains unclear if uveitis can occur as an adverse drug reaction, especially in pts. exposed to Etanercept (ETA).

Methods: The BIKER registry data base was used for analysis. Patient's history of uveitis, JIA category, the first occurrence of uveitis and exposure to Methotrexate (MTX), ETA, ADA and steroids were searched for. The number of first uveitis events occurring in each treatment category, the no. of exposed patients and exposure time until event were calculated.

Results: Of 3467 pts, 1700 were exposed to ETA, 364 to ADA and 1403 to MTX only. 335 pts (9.4%) had a history of uveitis before. In 75 pts (2.2%) uveitis was reported as an adverse event. Pts. with a known history of uveitis were more likely to have a new uveitis event (n=22; 6.8%; OR 2.9 [1.5-5.5]; p<0.001) than patients without. In 16 pts the first occurrence of uveitis was reported: 11 in the MTX cohort, 5 in the biologics cohort, 2 with ETA monotherapy and 3 with ETA&MTX. Uveitis events occurred more frequently in pts. with ext.oligoJIA (OR 2.4[1.4-3.9]; p=0.0005) and less likely systemic JIA (OR 0.22[0.03-1.59]; p=0.1) or rheumatoid factor pos. polyJIA (OR 0.19[0.03-1.34]; p=0.06) and more likely had ANA (OR 2.5 [1.5-4.1]; p<0.0003). Moreover, pts with an uveitis event were younger (4.6±4.1 years vs. 7.6±4.6 years; p<0.0001). Pts. with a history of uveitis before treatment with a biologic were more likely to receive ADA than ETA (OR 2.90 [2.06-4.08]; p<0.0001).

To analyze the influence of drug treatment on the occurrence of a first uveitis flare pts' treatments were categorised (table). Compared to the control group (MTX only) OR was significantly higher in pts receiving ETA monotherapy. It was not increased in combination with MTX. There were more uveitis events in pts on ADA±MTX in combination. Univariate analysis revealed that treatment with corticosteroids seems not to protect from uveitis, while MTX did. Pts. on ADA had significantly higher rates, while pts on ETA did not.

Conclusions: Risk factors for uveitis as an adverse event were history of uveitis and ETA mono therapy. MTX treatment did reduce the likelihood of uveitis whereas corticosteroids had no such effect. Few pts developed first uveitis when exposed to ETA with a rate comparable to the control group.

Disclosure of Interest: G. Horneff Grant/research support: Abbvie, Pfizer, Roche/Chugai, I. Foeldvari: None declared, K. Minden: None declared, K. Tenbrock: None declared, H. Huppertz: None declared, I. Becker: None declared
DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.2702

FRIDAY, 13 JUNE 2014

Abstract session: Emerging concepts in genomics and genetics
OP0187 DEVELOPING PROGNOSTIC BIOMARKERS FROM WHOLE BLOOD EXPRESSION PROFILING IN JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS: INFLUENCE OF EARLY THERAPY ON TREATMENT OUTCOME

J. Yao¹, K. Jiang², M.B. Frank³, Y. Chen², C.A. Wallace⁴, Y. Sun¹, J. Jarvis². ¹Microbiology; ²Pediatrics, University at Buffalo, Buffalo, NY; ³Arthritis & Immunology, Oklahoma Med Research Foundation, Oklahoma City, OK; ⁴Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA, United States

Background: We have recently demonstrated the feasibility of developing prognostic biomarkers from whole blood gene expression profiles in children with newly diagnosed juvenile idiopathic arthritis (JIA). However, determining disease status at one year was more challenging.

Objectives: To determine whether prognostic biomarkers for disease status at 12 months can be developed from whole blood gene expression profiles in children with JIA after the initiation of therapy.

Methods: We studied whole blood expression profiles from children enrolled in the TREAT study, an NIH-funded clinical trial comparing methotrexate (MTX) with MTX + etanercept (Et) in children with newly-diagnosed JIA. We extracted RNA from whole blood (PAXgene) samples using conventional methods and removed globin genes using Ambion GlobinClear reagents. Labeling, hybridization reactions, and scanning were performed using conventional methods for Illumina WG-6_V3 whole genome microarrays. Gene expression profiles were then examined to determine those genes whose expression levels best predicted outcome (active vs inactive disease) at 12 months.

Results: Predictive models could be developed at 6 months from baseline data, as we have previously reported. Baseline expression profiles could not predict status at 12 months. Using 4 month data (the earliest point at which samples were collected from children on treatment), we were able to construct receiver operator curves (ROC) with strong predictive properties for disease status at 12 months (AUC =0.89 for RF-negative patients). Thus, longer term outcome is predictable only after children have initiated therapy. When examining the transcriptional changes that occur between baseline and 4 months, we found numerous genes showing significant differential expression (absolute fold change > 1.2, p<0.05) in the RF negative (n=1,376) and RF positive (n=680) groups. Functional analysis of genes that showed differential expression between 0 and 4 months showed interesting differences between the RF negative and RF positive patients. In RF negative patients, DAVID analysis showed enrichment for immune response genes (p=2.89 E-.05) and genes associated with the respiratory burst (6.62 E-.05). It was also interesting to note that translational elongation (p=0.0013) and RNA splicing (p=0.0029) among the gene ontology (GO) terms enriched in the differentially expressed genes. For RF positive patients, the top 3 GO terms included macromolecular complex assembly (p=7.78E-.04), macromolecular complex subunit organization (p=0.002) and intracellular transport (p=0.004).

Conclusions: These studies show the feasibility of developing whole blood prognostic biomarkers in children with JIA. Longer term prognoses can only be made after therapy has been initiated. A curious additional finding in this study was the appearance of different mechanisms of response in RF positive and RF negative patients after 4 months of therapy, a finding that may explain the relative refractoriness of RF positive patients to otherwise effective therapies.

Acknowledgements: This work was supported by R01-AR-060604, R01-AI-084200, and R01-AR-049762 from the National Institutes of Health.

Disclosure of Interest: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.4625

OP0188 CIRCULATING MIRNAS AS POTENTIAL BIOMARKERS OF THERAPY EFFECTIVENESS IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH ANTI-TNF

N. Barbarroja¹, M.C. Castro¹, C. Perez-Sanchez¹, P. Ruiz-Limon¹, M.A. Aguirre¹, A. Escudero¹, Y. Jimenez-Gomez¹, R.M. Carretero¹, P. Font¹, E. Collantes-Estevez¹, R. Gonzalez-Conejero², C. Martinez², C. Lopez-Pedreria¹. ¹Research Unit/Rheumatology, Reina Sofia Hospital-Imibic, Cordoba; ²Regional Centre for Blood Donation, University of Murcia, Murcia, Spain

Background: The advent of anti-TNF α drugs has considerably improved medical management in Rheumatoid Arthritis (RA) patients, although it has been reported to be ineffective in a fraction of them. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that act as fine tuning regulators of gene expression. Targeting miRNAs by gain or loss of function approaches have brought therapeutic effects in various disease models.

Objectives: To investigate serum miRNA levels during the induction therapy by anti-TNF α drugs in RA patients in order to identify possible biomarkers, which could be predictive of the therapeutic effect of anti-TNF α .

Methods: Ninety five RA patients undergoing anti-TNF α therapy (54 treated with infliximab, 25 with etanercept and 15 with adalimumab) were enrolled. Serum samples for miRNA analyses were obtained at months 0 and 6, and the therapeutic efficacy of anti-TNF α therapy was assessed. MiRNAs were isolated from the serum of 10 patients before and after anti-TNF α therapy, cDNA transcribed and

Abstract OP0186 – Table 1

Treatment	Uveitis, n	Patients exposed	Rate	OR (CI)	p	Exposure years	Rate/1000 years (CI)	HR (CI)	p
MTX	25	1403	0.018	comparator	-	3459	7.2 (4.9-10.7)	comparator	-
ETA mono	17	475	0.036	2.1 (1.1-3.8)	0.022	1031	16.5 (10.3-26.5)	2.2 (1.2-4.1)	0.012
ETA+MTX	20	1225	0.016	0.9 (0.5-1.7)	0.769	3309	6.0 (3.9-9.4)	0.9 (0.5-1.6)	0.763
ADA mono	7	148	0.047	2.7 (1.2-6.4)	0.016	189	37.0 (17.7-77.7)	3.9 (1.7-9.1)	0.002
ADA+MTX	6	216	0.028	1.6 (0.6-3.9)	0.320	294	20.4 (9.2-45.4)	2.3 (0.9-5.6)	0.072
Steroids +	21	1174	0.018	0.8 (0.5-1.3)	0.278	2886	7.3 (4.7-11.2)	0.7 (0.4-1.2)	0.214
Steroids -	54	2293	0.024			5395	10.0 (7.7-13.1)		
MTX +	51	2844	0.018	0.5 (0.3-0.8)	0.001	7062	7.2 (5.5-9.5)	0.4 (25-0.65)	0.0002
MTX -	24	623	0.039			1220	19.7 (13.2-29.4)		
ETA +	37	1700	0.022	1.01 (0.6-1.6)	0.958	4340	8.5 (6.2-11.8)	0.98 (0.6-1.5)	0.935
ETA -	38	1767	0.022			3941	9.6 (7.0-13.3)		
ADA +	13	364	0.036	1.8 (0.99-3.3)	0.051	483	26.9 (15.6-46.4)	2.7 (1.5-4.9)	0.002
ADA -	62	3103	0.020			7798	8.0 (6.2-10.2)		

pooled. With each pool of samples, human serum & plasma miRNA PCR arrays (which identify 84 different miRNAs) were performed. Subsequently, a set of selected miRNAs were analyzed in a validation cohort consisting of miRNA from sera of all the patients included in the study. A number of inflammatory parameters were further analyzed by Flow-cytomix and correlation studies with clinical and serological variables evaluated were also performed.

Results: Six-month treatment with anti-TNF α therapy resulted in significant and clinically important improvements in all disease parameters examined (i.e. lower DAS28, SDAI, HAQ, VAS, ESR and CRP). No differences were demonstrated between the therapies administered. Among the serological markers, RF, IL-6 and IL-17 were found reduced. 85.9% of RA patients responded to the induction therapy by anti-TNF α and 18% reached clinical remission. Array analysis identified a 91.1% of miRNAs overexpressed and a 9.9% downregulated after therapy. Functional classification of upregulated miRNAs showed a 60% related to cardiovascular disease, T and B cell activation, inflammation and autoimmunity. Six out of 10 selected miRNAs for validation were found significantly upregulated by anti-TNF α treatment (miR-16, miR-23a, miR125b, miR-126a, miRN-146a, miR-223a). Responder's patients showed a stronger increase in those miRNAs than no responders, in parallel with the reduction of TNF α , IL6, IL17, RF and CRP. Correlation studies demonstrated multiple negative associations between validated miRNAs and clinical (DAS28, SDAI, HAQ, VAS, ESR, CRP), autoimmune (RF) and inflammatory parameters (IL-6).

Conclusions: 1. Anti-TNF α therapy in RA patients promote a significant change in the serum levels of a number of miRNAs associated to autoimmunity, inflammation, cardiovascular disease and lymphocyte B and T activation. 2. Close correlations exist among deregulated miRNAs and the positive response to treatment, underlying their potential as biomarkers and novel targets for treatment in patients with RA.

Acknowledgements: Supported by: P08-CVI-04234, CTS-7940, P112/01511, P111/00566, PI-0191-2013, Spanish Rheumatology Society

Disclosure of Interest: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.4103

OP0189 IDENTIFICATION OF DISEASE DIAGNOSTIC AND DISEASE ACTIVITY METABOLOMIC BIOMARKERS IN IMMUNE-MEDIATED INFLAMMATORY DISEASES

A. Alonso¹, J. Tornero², A. Fernández Nebro³, J. Cañete⁴, E. Domènech⁵, J.P. Gisbert⁶, C. Ferrández⁵, E. Fonseca⁷, V. García⁸, F. Blanco⁷, J. Rodríguez⁹, J. Gratacós¹⁰, P. Carreira¹¹, A. Julià¹, R. Tortosa¹, M.L. Lasanta¹, X. Correig¹², S. Marsal¹. ¹Rheumatology Research Group, Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Barcelona; ²Hospital Universitario Guadalajara, Guadalajara; ³Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga; ⁴Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona; ⁵Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona; ⁶Hospital Universitario de la Princesa, Madrid; ⁷Complejo Hospitalario Juan Canalejo, A Coruña; ⁸Hospital Universitario Reina Sofía, Madrid; ⁹Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona; ¹⁰Hospital Parc Taulí, Sabadell; ¹¹Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid; ¹²Metabolomics Platform, Tarragona, Spain

Background: Metabolomics is an emergent research field within the omics sciences aimed at characterizing the metabolome in complex biological samples. The advances in metabolomics are leading to a better knowledge of the regulatory processes on biological systems and, ultimately, of the metabolic disturbances related to pathological processes.

The present study represents the first metabolomic analysis on a large cohort including multiple immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs).

Objectives: This study is aimed at identifying disease diagnostic and disease activity biomarkers through the analysis of the whole urine metabolome on 1,200 IMID patients and 100 control individuals.

Methods: Spectral proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) data of urine samples was acquired among 6 disease cohorts (n=200 Spanish patients per cohort) including: rheumatoid arthritis (RA), psoriasis (PS), psoriatic arthritis (PA), Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) and systemic lupus erythematosus (SLE). Patients on each cohort were selected in order to be equally distributed among groups of low and high disease activity. Furthermore, ¹H-NMR data of 100 control individuals were also acquired in this study.

The quantification of the spectral peaks containing the metabolic information was performed by a powerful methodology¹ to process the spectral data. Mann-Whitney U test was used to evaluate the association of metabolic peaks with each IMID cohort. Subsequently, association with disease activity was also evaluated.

Results: After processing the spectral data n=473 peaks were identified, from which n=145 passed the quality control filters.

The statistical analysis identified 45 metabolic peaks significantly associated (P-Value<1E-4) in at least one of the performed disease diagnostic or disease activity tests. The aggregated IMID analysis identified n=16 peaks associated with disease diagnostic and n=9 peaks associated with disease activity. When analyzing each IMID cohort separately, RA, SLE, CD and UC obtained the largest number of diagnostic biomarker candidates: n=27, n=14, n=18 and n=21 respectively. PS and PA showed lower differences against controls. On the other side, when comparing low to high disease activity patients a lower number of significant associations (n=5; P-Value<5E-3) were observed, mainly related to CD and RA.

Conclusions: Significant urine metabolic differences have been identified on

this first large cohort of jointly analyzed IMIDs. The results have shown large differences on some metabolic peaks when comparing the IMID cohorts against controls. These results evidence the high potential of the diagnostic properties of the urine metabolome. Although the differences are lower when evaluating disease activity, the identified candidates are of great interest.

References:

[1] Alonso, A., et al. Analytical Chemistry 2013, 86, 1160.

Disclosure of Interest: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.4927

OP0190 PERSONALIZED GENETIC MEDICINE: AMINO ACID POSITIONS 11, 71 AND 74 IN HLA-DRB1 PREDICT DISEASE SEVERITY, TREATMENT RESPONSE AND MORTALITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS; MULTI-CENTRE PROSPECTIVE COHORT STUDIES

S. Viatte¹, D. Plant¹, B. Han², B. Fu¹, A. Yarwood¹, W. Thomson¹, D.P. Symmons³, J. Worthington¹, A. Young⁴, K.L. Hyrich³, A.W. Morgan⁵, A.G. Wilson⁶, J.D. Isaacs⁷, S. Raychaudhuri², A. Barton¹, on behalf of Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate BRAGGSS. ¹Arthritis Research UK Centre for Genetics and Genomics, Manchester, United Kingdom; ²Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, United States; ³Arthritis Research UK Epidemiology Unit, Manchester; ⁴St. Albans City Hospital, St. Albans; ⁵Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, Leeds, United Kingdom; ⁶Conway Institute of Biomolecular & Biomedical Research, Dublin, Ireland; ⁷Musculoskeletal Research Group, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Background: The shared epitope (SE) is a group of alleles of the HLA DRB1 gene and was thought to have the strongest effect on rheumatoid arthritis (RA) susceptibility. However, recently, HLA-DRB1 position 11, outside of the classical SE, has been shown to be a stronger predictor of RA susceptibility. Positions 11,71 and 74 define 16 haplotypes, the effect of which ranges from risk to protective on RA susceptibility. Their effect on RA severity, treatment response or mortality in patients has not previously been studied.

Objectives: To assess whether HLA-DRB1 positions 11,71,74 can also be used to predict radiological outcome, anti-TNF response and mortality in patients with RA.

Methods: We used 3 independent prospective cohort studies: The Norfolk Arthritis Register-NOAR (1691 patients with 2811 x-rays); the Early Rheumatoid Arthritis Study-ERAS (421 patients with 3758 x-rays); a cohort from 57 UK centres-BRAGGSS (1846 patients with treatment response). HLA typing was determined using a reverse dot-blot method or dense genotyping of the HLA region by the ImmunoChip array, followed by imputation. Longitudinal modelling of the presence of erosions was performed with generalized estimating equation (GEE) models whilst the Larsen score was modelled with Generalized Linear Latent and Mixed Modelling (GLLAMM). Change in Disease Activity Score28 was modelled with linear regression and EULAR response with ordinal logistic regression. Cox proportional hazard models were used for all cause and cardiovascular mortality studies.

Results: Valine at position 11 of HLA-DRB1 (Val11) is a new and the strongest independent genetic determinant of radiological damage in RA and this finding has been replicated in separate cohorts (OR in NOAR: 1.75, 95%CI 1.52 to 2.01, p=8.7E-15). Positions 71 and 74 represent independent predictors and the 3 positions define 16 haplotypes strongly associated with disease outcome (multivariate p=2.83E-12), superseding the SE. The hierarchy, ranging from risk to protective effects, is perfectly correlated with that observed for disease susceptibility. HLA-DRB1 haplotypes associated with RA susceptibility and severe outcome are also predictors of good treatment response with anti-TNF therapy. For example, the Val11Lys71Ala74-haplotype, carried by 52% of patients, is associated with good EULAR response (OR: 1.24 95%CI 1.07 to 1.44 p=5.31E-03). On average, 17 patients need to be treated with anti-TNF to see one more patient responding better, based solely on the carriage of this haplotype. Both all-cause and cardiovascular mortality are also predicted by the 16 haplotypes.

Conclusions: Combinations of amino-acids at positions 11, 71 and 74 of the HLA-DRB1 gene predict severe disease, treatment response and mortality in RA, superseding the classical SE. At disease onset, this allows stratification of patients to identify those at risk of joint damage and early death but who are more likely to respond to anti-TNF biologic therapy.

Disclosure of Interest: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.3155

OP0191 DISEASE-ASSOCIATED SNPS FROM NON-CODING REGIONS IN JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS ARE LOCATED WITHIN OR ADJACENT TO FUNCTIONAL GENOMIC ELEMENTS OF HUMAN NEUTROPHILS

K. Jiang¹, T. Liu², M.J. Buck², Y. Chen¹, B. Carrier¹, J. Jarvis¹. ¹Pediatrics; ²Biochemistry, University at Buffalo, Buffalo, New York, United States

Background: The completion of a large genome-wide associate study (GWAS) for juvenile idiopathic arthritis (JIA) revealed multiple regions conferring disease risk [1]. However, the majority of disease-associated SNPs occurred in non-coding regions of the genome.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300126552	
Application number	EP14382178.3	
File No. to be used for priority declarations	EP14382178	
Date of receipt	22 May 2014	
Your reference	900 411	
Applicant	Servicio Andaluz de Salud	
Country	ES	
Title	Circulating miRNAs as biomarkers of therapy effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients treated with anti-TNFalpha	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\900 411 Description.pdf (29 p.) SPECEPO-3.pdf\900 411 Abstract.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip\900 411 FIBICO-14009 borradorFIN.zip f1002-1.pdf (1 p.) f1002-3.pdf (1 p.) f1002-5.pdf (1 p.) f1002-7.pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\900 411 Claims.pdf (2 p.) SPECEPO-4.pdf\900 411 Figures.pdf (8 p.) SEQLTXT.txt\900 411 Untitled_ST25.txt f1002-2.pdf (1 p.) f1002-4.pdf (1 p.) f1002-6.pdf (1 p.) feesheetint.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=G. Fuster 26814,O=Hoffmann Eitle,C=DE	

Method of submission | Online

Date and time receipt | 22 May 2014, 18:54:39 (CEST)
generated

Official Digest of | A7:30:76:61:35:D3:5B:B5:43:7D:C9:20:8E:44:8E:EC:83:E0:C0:F3
Submission

/Madrid, Oficina Receptora/