

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Influencia del bloqueo del factor de necrosis tumoral-alfa sobre los niveles del factor reumatoide y anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados en pacientes con artritis reumatoide**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Lina Patricia Martínez Estupiñán**

Directores

**Luis Carreño Pérez  
Luis Collado Yurrita**

Madrid, 2016

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Medicina



**Influencia del bloqueo del factor de necrosis tumoral-alfa sobre los niveles del factor reumatoide y anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados en pacientes con Artritis Reumatoide**

**Lina Patricia Martínez Estupiñán**

Directores:

Luis Carreño Pérez

Luis Collado Yurrita

Para mis padres, Gabriel y Miryam  
Para mis tutores y mis compañeros durante la residencia.

## Índice

Abreviaturas .....	9
Abstract.....	12
Resumen.....	21
<b>1. Introducción.....</b>	<b>30</b>
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de AR.....	32
1.2.1 Componente genético.....	32
1.2.1.1 Genes de los antígenos leucocitarios humanos.....	32
1.2.1.2 Genes no-HLA.....	34
1.2.2 Factores ambientales.....	35
1.2.2.1 Tabaquismo.....	35
1.3 Transición a la enfermedad clínica: posibles mecanismos de iniciación de la artritis.....	36
1.3.1 Alteraciones inmunológicas preclínicas.....	37
1.3.1.1 Factor reumatoide.....	37
1.3.1.2 Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados.....	38
1.4 Interacciones entre factores genéticos, serológicos y ambientales.....	42
1.5 Inflamación de la membrana sinovial.....	44
1.5.1 Sistema inmune adaptativo.....	45
1.5.1.1 Linfocitos T.....	45
1.5.1.2 Linfocitos B.....	47
1.5.2 Sistema inmune innato.....	48
1.6 Aspectos clínicos de la artritis reumatoide.....	49

1.6.1 Manifestaciones clínicas.....	49
1.6.2 Diagnóstico.....	50
1.7 Tratamiento .....	52
1.7.1 FAME sintéticos.....	52
1.7.2 FAME biológicos.....	53
1.7.2.1 Bloqueadores del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	53
1.8 Recomendaciones para el tratamiento de la AR.....	54
1.9 Seguimiento de la enfermedad.....	56
1.9.1 Actividad inflamatoria.....	56
1.9.1.1 Recuentos articulares.....	57
1.9.1.2 Evaluación del dolor.....	58
1.9.1.3 Evaluación global de la enfermedad.....	58
1.9.1.4 Reactantes de fase aguda.....	58
1.9.2 Índices de actividad.....	59
1.9.2.1 Clasificación de la actividad inflamatoria basada en índices.....	60
1.9.3 Daño estructural.....	60
1.9.4 Niveles séricos del fármaco y anticuerpos anti-fármaco.....	61
1.9.5 Autoanticuerpos.....	65
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>67</b>
2.1 Objetivo principal.....	68
2.2 objetivos secundarios.....	68

<b>3. Materiales y métodos</b> .....	69
3.1 diseño.....	70
3.2 Selección de pacientes.....	70
3.2.1 Criterios de inclusión.....	70
3.2.2 Criterios de exclusión .....	70
3.3 Variables recogidas.....	71
3.3.1 Variables demográficas.....	71
3.3.2 Variables epidemiológicas.....	71
3.3.3 Variables clínicas y analíticas.....	71
3.3.4 Variables serológicas estudiadas.....	72
3.4 Métodos.....	72
3.4.1 Actividad de la enfermedad.....	74
3.4.2 Sueros.....	74
3.4.3 Concentraciones séricas de IFX y de ADAb.....	75
3.4.3.1 Concentraciones séricas de IFX.....	75
3.4.3.2 Concentraciones séricas de ADAb.....	75
3.4.3.3 Análisis de los resultados.....	76
3.4.4 Concentraciones séricas de FR y anti-PCC.....	77
3.4.4.1 Concentración sérica de los anti-PCC isotipo IgG.....	77
3.4.4.2 Concentraciones séricas de los anti-PCC isotipos IgA e IgM.....	79
3.4.4.3 Concentración sérica del FR isotipo IgM.....	79
3.5 Análisis estadístico.....	80
<b>4. Resultados</b> .....	82

4.1 Características demográficas y clínicas basales de los pacientes.....	83
4.2 Concentraciones séricas de IFX y ADA b.....	84
4.3 Características clínicas basales de los pacientes IFX-pos/IFX-neg.....	85
4.4 Características clínicas de los pacientes IFX-pos/IFX-neg al momento de la segunda muestra.....	86
4.5 Relación entre los niveles de autoanticuerpos y la presencia de IFX.....	87
4.5.1. Concentraciones basales de los autoanticuerpos.....	87
4.6 Comparación del cambio en las concentraciones de los anti-PCC y el FR, antes y después del tratamiento con IFX, entre los pacientes IFX-positivo y los pacientes IFX-negativo.....	88
4.6.1 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgG.....	88
4.6.2 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgM.....	89
4.6.3 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgA.....	90
4.6.4 Cambio en la concentración del FR isotipo IgM.....	91
<b>5. Discusión.....</b>	<b>93</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>104</b>

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Manifestaciones extra-articulares de la AR.....	50
Tabla 2. Criterios de clasificación de la AR .....	51
Tabla 3. FAME sintéticos y su mecanismo de acción principal.....	52
Tabla 4. Otros FAME biológicos.....	54
Tabla 5. Puntos de corte para las categorías de actividad según los diferentes índices.....	60
Tabla 6. Incidencia y asociaciones clínicas de los ADA b en los diferentes estudios.....	62
Tabla 7. Incidencia y asociaciones clínicas de los ADA b en los diferentes estudios.....	63
Tabla 8. Relación entre la concentración de FR y anti-PCC y la respuesta a anti-TNF- $\alpha$ .....	65
Tabla 9. Definición de la actividad de la enfermedad según DAS28.....	74
Tabla 10. Características demográficas y clínicas basales.....	83
Tabla 11. Características demográficas y clínicas basales.....	84
Tabla 12. Concentraciones séricas de IFX y ADA b en IFX-pos e IFX-neg.....	85
Tabla 13. Características basales de los pacientes IFX-pos e IFX-neg.....	85
Tabla 14. Características clínicas al momento de la segunda muestra de los pacientes IFX-pos e IFX-neg.....	86
Tabla 15. Concentraciones basales de FR y anti-PCC en IFX-pos e IFx-neg.....	88

## **Índice de figuras**

Figura 1. Conversión de peptidil-arginina en peptidil-citrulina, catalizada por la enzima deaminasa de peptidil-arginina (PAD).....	40
Figura 2. Esquema de la interacción entre los diferentes factores ambientales y genéticos asociados a la AR y la transición a la enfermedad clínica.....	43
Figura 3. Aspecto histopatológico de la sinovial de la AR.....	45
Figura 4. Interacción entre la célula T y la célula B.....	48
Figura 5. Fármacos anti-TNF- $\alpha$ .....	53
Figura 6. Fármacos anti-TNF- $\alpha$ .....	54
Figura 7. Guías de recomendación EULAR para el manejo de la AR.....	55
Figura 8. Esquema de las 28 articulaciones incluidas en el DAS28.....	57
Figura 9. Diagrama del estudio.....	73
Figura 10. Esquema de los ELISA para medir los niveles séricos de IFX y ADA b.....	76
Figura 11. Relación entre la presencia de IFX y ADA b .....	84
Figura 12. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgG.....	89
Figura 13. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgM.....	90
Figura 14. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgA.....	91
Figura 15. Cambio en la concentración del FR isotipo IgM.....	92



ACR	Colegio Americano de reumatología ( <i>American College of Rheumatology</i> ),
ADA	Adalimumab
ADAb	Anticuerpos anti-fármaco ( <i>antidrug antibodies</i> )
AKA	Anticuerpos antiqueratina ( <i>antikeratin antibodies</i> )
Anti-PCC	Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados
Anti-TNF- $\alpha$	Bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa
APF	Anticuerpos anti-factor perinuclear ( <i>antiperinuclear factor antibodies</i> )
APRIL	Ligando inductor de la proliferación ( <i>a proliferation-inducing ligand</i> )
AR	Artritis reumatoide
ATTRACT	( <i>Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with concomitant Therapy</i> )
BlyS	Estimulador de la célula B ( <i>B lymphocyte stimulator</i> )
CDAI	Índice de la actividad de la enfermedad clínico ( <i>Clinical Disease Activity Index</i> )
CTLA4-Ig	Antígeno de linfocitos T citotóxicos 4.
CZP	Certolizumab pegol
DAS	índice de actividad de la enfermedad ( <i>Disease Activity Score</i> )
DE	Desviación estándar
ELISA	Inmunoensayo ( <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> )
EMA	Agencia Europea de los medicamentos ( <i>European Medicines Agency</i> )
emAR	Estudio de la variabilidad en el manejo de la AR en España
ETN	Etanercept
EULAR	Liga Europea contra las enfermedades reumáticas ( <i>European League Against Rheumatism</i> )
FAME	Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
Fc	Fracción cristalizable
FcyRIIa	Receptor para Fc de la IgG ( <i>Low-Affinity IgG Receptor</i> )
FDA	( <i>Food and Drug Administration</i> )
FR	Factor reumatoide
GOL	Golimumab
HDTB	Hospita del día de terapias biológicas
HLA	Antígenos leucocitarios humanos ( <i>human leukocyte antigens</i> )
HRP	Enzima peroxidasa de rábano

IFP	Interfalángica proximal
IFX	Infliximab
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
MCF	Metacarpofalángica
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MTF	Metatarsofalángica
MTX	Metotrexato
NK	Células asesinas naturales ( <i>natural killers</i> )
PAD	deaminasa de peptidil-arginina
PBS	( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Proteína C reactiva
PEG	Pegilado
PIA	( <i>pH-shift anti-idiotypic antigen-binding test</i> ).
PTPN22	Proteín tirosín fosfatasa no 22
RIA	Radioinmunoprecipitación ( <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> ).
SDAI	Índice de actividad de la enfermedad simplificado( <i>Simplified Disease Activity Index</i> )
SE	Epítoto compartido ( <i>shared epitope</i> )
T reg	Células T reguladoras
TCR	Receptor de la célula T ( <i>T cell receptor</i> )
Th1	Linfocito T ayudador 1
TLRII	Receptor tipo toll ( <i>toll like receptor</i> )
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>tumoral necrosis factor</i> )
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> )
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor receptor 2</i> )
VSG	Velocidad de sedimentación globular

**Abstract**

Antagonists of the tumor necrosis factor (anti-TNF- $\alpha$ ) have become the most widely used biological therapies for patients with Rheumatoid Arthritis (RA). However, despite an impressive overall clinical impact, more than one quarter of patients still have a poor response to these biological agents. There is a great need for predictive factors of response to anti-TNF- $\alpha$  since these drugs may have side effects and are costly. The rheumatoid factor (RF) and antibodies to citrullinated peptides (ACPA) have been studied by several groups as serological parameters to monitor disease activity in patients treated with anti-TNF- $\alpha$ . At the moment the relationship between these autoantibodies and the response to anti-TNF- $\alpha$  is not absolute and clearly defined. It is remarkable that none of these studies considered the free levels of the drug and did not differentiate between primary and secondary efficacy losses, due to the presence of anti-drug antibodies.

Different groups have demonstrated that the lack of response to the anti-TNF- $\alpha$  in some non-responder patients is associated with the development of antibodies against the anti-TNF- $\alpha$  drug called antidrug antibodies (ADAb), which correlates with lower levels of the drug in blood.

The aim of this study is to assess, in RA patients treated with infliximab (IFX), the influence of the free levels of the drug on the serum levels of RF and ACPA.

## **Objective**

The aim of this study was to investigate the relationship between serum infliximab (IFX) levels and changes of RF and ACPA levels in patients with RA.

## **Patients and Methods**

Nineteen patients fulfilling the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for RA treated with IFX as a first line of biology therapy were enrolled in the study.

The pre-treatment and after treatment with IFX sera were obtained in the serum bank of Rheumatology service.

The disease activity was assessed using the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) according to reactive C protein.

Serum IFX and ADA<sub>b</sub> levels were measured using a commercial test of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Promonitor®-IFX kit, Progenika Biopharma, Spain) according to the manufacturer's instructions. Both assays are approved by the United States Food and Drug Administration and the European Medicines Agency.

In order to measure the levels of autoantibodies in sera, an ELISA test was used. All samples from each patient were tested simultaneously and all the tests were

done by the author. The autoantibodies measured in this study included IgG, IgM and IgA ACPA and IgM RF.

Descriptive statistics will include mean, standard deviation (SD), median and interquartile range (IQR). Frequency data will be compared by the Pearson's chi-square. Differences in quantitative values between groups will be analyzed using T student or the Mann-Whitney test. Variation in the RF and ACPA levels was analyzed by means of the Wilcoxon rank-sum test.

Statistical significant differences will be considered if p value is less than 0.05. All analyses will be performed using SPSS V.17.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

## **Results**

### Demographic and Clinic Baseline Characteristics of Patients

The majority of patients studied were women 16 (84%). The mean age, standard deviation (SD) at the time of initiation of treatment with IFX was 58 (13). Twelve (63%) patients were taking prednisone and fifteen (89%) were taking some synthetic DMARD at the time of starting treatment with IFX. Fourteen (74%) patients were positive for RF IgM. Sixteen (84%), 18 (95%) and 10 (53%) patients were positive for anti-CCP IgM, IgG and IgA, respectively. All patients were active according to the DAS28 at the time of starting treatment with IFX.

### Serum Concentrations of IFX, ADAb and Disease activity

Eight (42%) of the 19 patients had detectable serum levels of infliximab (IFX-pos) and 11 (58%) patients lacked these levels (IFX-neg).

Nine (47%) of our patients had ADAb. Eight (72%) of the 11 IFX-neg patients had ADAb while only one (12%) out of the 8 IFX-pos patients ( $p=0,009$ ). On the latter patient, serum levels of IFX were low.

Half of the IFX-pos patients were in remission or low disease activity and only one (9%) of the patients IFX-neg reached this condition.

There were no statistically significant differences in the mean dose of IFX administered and the mean baseline levels of RF isotype IgM and ACPA isotypes IgA, IgM and IgG between the IFX-pos and IFX-neg patients ( $p=0,6$ ,  $p=0,09$ ,  $p=0.73$  y  $p=0.38$ , respectively).

### ACPA and RF variation during infliximab treatment

Based on the IFX levels, we assessed the change in the autoantibodies levels before and after treatment.

In the IFX positive group, the serum levels of ACPA IgM, ACPA IgA, ACPA IgG and RF IgM decreased significantly after treatment ( $p=0.03$ ,  $p=0.01$ ,  $p=0,07$  and  $p=0.01$ , respectively). In the group of patients IFX negative, no significant changes in ACPA and RF levels were observed.

## **Discussion**

The main objective of this study was to investigate the relationship between serum infliximab (IFX) levels and changes of RF and ACPA levels in patients with RA.

This study included 19 AR patients who had been treated with IFX as the first-line biological therapy. Clinical profiles of these patients are similar to those described in the emAR study by the Spanish Society for Rheumatology.

Eight out of 19 patients were IFX positive and 11 patients were IFX negative. There were no statistically significant demographic or clinical differences at baseline between the IFX positive and IFX negative patients. As well, no statistically significant difference in the mean administered dose of IFX was found between the groups.

There was a statistically significant relationship between the presence of serum IFX and treatment response. Half of the IFX positive patients showed remission or low disease activity, while only one of the IFX negative patients reached this condition.

Nine (47%) of the 19 patients had ADA<sub>b</sub>. ADA<sub>b</sub> presence was associated to the absence of serum IFX at detectable levels. Eight (78%) IFX negative patients had ADA<sub>b</sub> while only one (12%) of the IFX positive patients did ( $p$  0,009). In this last case, serum IFX concentration was low.

After treatment, those patients who presented detectable levels of serum IFX presented significant decrease in serum levels of ACPA IgA, IgM and IgG isotypes and the RF of the IgM isotype. On the other hand, IFX negative patients did not show any significant changes in the serum levels of these autoantibodies.

As part of RA's pathogenesis, there is a complex interaction among the different cells and molecules of the innate and adaptive immune system. The effectiveness of treatments targeting TNF- $\alpha$  and B cells has indirectly proven the role they play in RA.

TNF- $\alpha$  has a direct impact on B cells through the TNFR1 and TNFR2 receptors present on their membrane. It also takes part in the development of follicular dendritic cells which are essential to the formation of germinal centers in the secondary lymphoid organs.

On the other hand, B cells produce TNF- $\alpha$ . It may be reasonable to propose that anti-TNF- $\alpha$  drugs' effectiveness might be linked to a possible anti-B cells effect and the B cell depletion could mimicking any of the anti-TNF's effects by suppressing a TNF- $\alpha$  source.

Anolik, et al. studied the effect of anti- TNF- $\alpha$  based treatment on the secondary lymphoid organs and on the B cells subpopulation in peripheral blood of RA patients. They studied B cells subpopulations in peripheral blood and carried out immunohistochemistry analyses in tonsil biopsy samples taken from both healthy patients and RA patients who had been treated with etanercept.

They found that the follicular dendritic cells proportion, as well as the number and size of germinal centers in the secondary follicles were significantly lower in patients treated with anti-TNF. In peripheral blood, patients treated with anti-TNF showed a significantly lower amount of memory B cells.

In the case of this study, the decrease in the concentration of RF and ACPA was linked to the presence of free serum IFX. Such findings coincide with those by Anolik et al. since in the RA patients' synovial membrane, structures similar to germinal centers appear and its disruption by anti-TNF therapy could interrupt interactions between T cells and B cells normally occurring at these germinal centers and which are essential for antibodies (AB) production. Additionally, anti-TNF treatment affects B cell subpopulations decreasing the amount of memory B cells in peripheral blood, precursors of plasmablasts which produce specific AB such as RF and ACPA.

In conclusion, it was observed that a higher number of patients with appropriate drug concentration reach the remission stage of the disease, just as it had been observed in other studies. As well, this study found that there is an inverse relationship between ADA<sub>b</sub> presence and free serum concentration of the drug. The most revealing result was that the drop in concentration of ACPA and RF in RA patients who have been treated with IFX is associated to the presence of adequate serum concentrations of the drug. This comes to support the role played by anti- TNF- $\alpha$  in the modification of the disease, not only as anti-cytokine therapy,

but by indirectly showing its effects on B cells and the development of autoantibodies.

## **Resumen**

La respuesta clínica a los anti-TNF- $\alpha$  en los pacientes con Artritis Reumatoide (AR) es muy variable, en muchos casos se logra la remisión de la enfermedad, sin embargo una cantidad sustancial de pacientes no responden y persisten con actividad de la enfermedad o presentan recaídas a pesar del tratamiento.

Los marcadores clínicos, radiológicos, serológicos y genéticos disponibles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tienen un valor limitado a la hora de predecir de manera precisa la respuesta al tratamiento y las recaídas.

El factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC) son los principales marcadores biológicos en la AR y forman parte de los criterios de clasificación de la enfermedad, sin embargo, la relación entre los cambios en la concentración de estos autoanticuerpos y la respuesta a los anti-TNF- $\alpha$  es variable en los diferentes estudios y no se aceptan como factores de predicción y de seguimiento de la respuesta a estos fármacos.

Las concentraciones séricas del fármaco y los anticuerpos anti-fármaco (*ADAb anti-drug antibodies*) han sido estudiados como marcadores séricos relacionados con la actividad de la enfermedad. Diferentes investigadores han demostrado que la pérdida de eficacia a los anti-TNF- $\alpha$  está asociada con el desarrollo de ADAb, que a su vez se correlaciona con la ausencia de concentraciones séricas adecuadas del fármaco.

Hasta el momento en ningún estudio se ha evaluado el efecto de la concentración libre del medicamento en las concentraciones de FR y anti-PCC y su relación con la actividad de la enfermedad.

### **Objetivo:**

El objetivo de este trabajo es estudiar el cambio de las concentraciones de FR y anti-PCC antes y después del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  en sueros de pacientes con AR y su relación con la concentración sérica del fármaco.

### **Pacientes y métodos**

En este trabajo se estudiaron 19 pacientes con AR que fueron tratados con infliximab (IFX) como primera línea de terapia biológica. Los sueros de los pacientes antes y después del tratamiento se obtuvieron de la seroteca del Servicio de Reumatología del hospital Gregorio Marañón (1998-2011).

La actividad de la enfermedad se estimó con el índice de actividad de DAS28.

Las concentraciones séricas de IFX y de HACAs se midieron mediante técnicas de ELISA (Progenika Biopharma, Spain), siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante.

Las concentraciones séricas de FR y anti-PCC se midieron con técnicas de ELISA en las muestras de suero basal y tras el tratamiento con IFX. Se obtuvieron las concentraciones séricas de los isotipos IgG, IgM e IgA para los anti-PCC y del isotipo IgM para el FR. Todas las mediciones de cada paciente se realizaron al mismo tiempo.

Se calcularon la media y desviación estándar de la media para las diferentes variables cuantitativas. Las variables categóricas se presentan mediante frecuencias y porcentajes.

La relación entre las variables categóricas se evaluó mediante el test chi-cuadrado. La comparación de medias para variables cuantitativas se realizó con la prueba de Mann Whitney para muestras independientes y se utilizó la prueba de rango de signos de Wilcoxon para examinar los cambios en los niveles de autoanticuerpos.

En todos los análisis se consideró un nivel de significación estadística a un valor de la  $p < 0.05$ .

## **Resultados:**

### Características demográficas y clínicas basales de los pacientes

La mayoría de los pacientes estudiados fueron mujeres 16 (84%). La edad media, desviación estándar (DE) al momento del inicio del tratamiento con IFX era de 58

años (13) (23-79). Doce (63%) pacientes tomaban prednisona y quince (89%) tomaban algún FAME sintético al inicio del tratamiento con IFX. Catorce (74%) de los pacientes fueron positivos para FR IgM. Dieciséis (84%), 18 (95%) y 10 (53%) pacientes fueron positivos para anti-PCC IgM, IgG e IgA, respectivamente. Todos los pacientes tenían actividad de la AR según el DAS28

#### Concentraciones séricas de IFX, ADA b y actividad de la enfermedad

Ocho (42%) de los 19 pacientes tenían concentraciones séricas detectables de IFX (IFX-pos) y 11 (58%) pacientes no las tenían (IFX-neg).

Nueve (47%) de nuestros pacientes tenían ADA b. Ocho (72%) de los 11 pacientes IFX-neg tenían ADA b y sólo uno (12%) de los 8 pacientes IFX-pos ( $p=0.009$ ), en este último paciente las concentraciones séricas de IFX eran bajas.

La mitad de los pacientes IFX-pos se encontraban en remisión o baja actividad de la enfermedad y solo uno (9%) de los pacientes IFX-neg alcanzó esta condición,

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la dosis media de IFX administrada, el tratamiento concomitante con fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs) sintéticos y los niveles basales de FR y anti-PCC entre estos dos grupos ( $p=0,36$ ,  $p=0,65$ ,  $p=0.52$  y  $p=0.77$ , respectivamente).

## Comparación del cambio en las concentraciones del FR y anti-PCC, antes y después del tratamiento con IFX, entre los pacientes IFX-positivo y los pacientes IFX-negativo

Los pacientes IFX-pos presentaron una disminución significativa de los niveles de FR isotipo IgM ( $p=0.01$ ) y Anti-PCC isotipo IgM ( $p=0.01$ ), IgA ( $p=0,03$ ) e IgG ( $p=0,007$ )

En los pacientes IFX-neg no hubo cambios significativos en las concentraciones de los diferentes isotipos del FR y los Anti-PCC.

## **Discusión**

Se estudiaron 19 pacientes con AR que fueron tratados con IFX como primera línea de terapia biológica. Las características clínicas de estos pacientes son similares a las descritas en el estudio emAR de la Sociedad Española de Reumatología

Ocho de los 19 pacientes fueron IFX-positivo y 11 pacientes fueron IFX-negativo. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas y clínicas basales de los pacientes IFX-pos e IFX-neg. No encontramos diferencias en la media de tiempo de tratamiento y dosis media de IFX.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de IFX sérico y la respuesta al tratamiento. La mitad de los pacientes IFX-pos se encontraban en remisión o baja actividad de la enfermedad y solo uno (9%) de los pacientes IFX-neg alcanzó esta condición,

Nueve (47%) de nuestros pacientes tenían ADAb. La presencia de ADAb se asoció a la ausencia de concentraciones séricas detectables de IFX, 8 (78%) de los pacientes IFX-neg tenían ADAb en comparación a sólo uno (12%) de los pacientes IFX-pos (p 0,009). En este último paciente las concentraciones séricas de IFX eran bajas.

Los pacientes que tenían concentraciones séricas detectables de IFX presentaron un descenso significativo en las concentraciones séricas de los autoanticuerpos anti-PCC de los isotipos IgA, IgM e IgG y del FR isotipo IgM. Los pacientes IFX-neg no presentaron cambios significativos en las concentraciones séricas de estos autoanticuerpos antes y después del tratamiento.

En la patogenia de la AR existe una compleja interacción entre las diferentes células y moléculas del sistema inmune innato y adaptativo. El papel del TNF- $\alpha$  y de las células B en la AR ha sido demostrado indirectamente por la eficacia clínica de los tratamientos dirigidos contra estas dianas.

El TNF- $\alpha$ , además, tiene un efecto directo sobre las células B a través de los receptores TNFR1 y TNFR2 presentes en la membrana de estas células y

participa en el desarrollo de las células dendríticas foliculares esenciales para la formación de los centros germinales en los órganos linfoides secundarios.

Las células B, a su vez, son productoras de TNF- $\alpha$ , por lo que es razonable postular que la eficacia de los fármacos anti- TNF- $\alpha$ , podría estar mediada por un posible efecto anti-células B y la depleción de células B podría imitar alguno de los efectos de los anti- TNF- $\alpha$ , mediante la eliminación de una fuente de TNF- $\alpha$ .

Anolik et al. estudiaron el efecto del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  sobre los órganos linfoides secundarios y en las subpoblaciones de células B en sangre periférica en pacientes con AR. Estos investigadores analizaron las subpoblaciones de células B en sangre periférica y realizaron análisis de inmunohistoquímica en biopsias de amígdalas tomadas de pacientes con AR tratados con etanercept y en individuos sanos y encontraron que tanto la proporción de células dendríticas foliculares, como el número y el tamaño de los centros germinales en los folículos secundarios era significativamente inferior en los pacientes tratados con anti-TNF- $\alpha$ . En sangre periférica los pacientes tratados con anti-TNF- $\alpha$  presentaban una proporción significativamente menor de células B de memoria.

En nuestros pacientes el descenso en las concentraciones de FR y anti-PCC estuvo asociado a la presencia de IFX sérico libre, estos hallazgos concuerdan con los resultados encontrados por Anolik et al., ya que en la sinovial de los pacientes con AR aparecen estructuras como centros germinales, la alteración de estos con la terapia anti-TNF podría interrumpir las interacciones celulares que se

producen en estos centros germinales entre células T y células B, las cuales son esenciales para la producción de anticuerpos. Además el tratamiento con anti-TNF altera las subpoblaciones de células B, disminuyendo la proporción de células B de memoria en sangre periférica que son las precursoras de los plasmablastos que son las células productoras de Ac específicos como el FR y ACPA.

En conclusión en este estudio observamos que una proporción mayor de pacientes con concentraciones séricas adecuadas del fármaco alcanzaron la remisión de la enfermedad como se ha observado en otros estudios y que existe una relación inversa entre la presencia de ADA<sub>B</sub> y la concentración sérica libre del fármaco. El resultado más relevante es que observamos que la disminución en las concentraciones de anti-PCC y FR en pacientes con AR tratados con IFX, está relacionada con la presencia de concentraciones séricas adecuadas del fármaco. Esto apoya el papel de los anti-TNF- $\alpha$  en la modificación de la enfermedad no solo actuando como una terapia anticitoquina sino demostrando indirectamente su efecto sobre la célula B y la formación de autoanticuerpos.

## **1. Introducción**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, inflamatoria y crónica caracterizada por la inflamación persistente de las articulaciones sinoviales, lo que produce una destrucción articular progresiva y la consiguiente incapacidad funcional. Con frecuencia compromete a otros órganos y tiene un impacto muy negativo sobre la calidad de vida [1].

Es la artritis inflamatoria y la enfermedad autoinmune más común, afecta del 0,5 al 1% de la población general, aunque la prevalencia es variable en diferentes áreas geográficas [2, 3].

Su etiología es desconocida. En general se acepta que es una enfermedad autoinmune, tanto por las alteraciones inmunológicas relacionadas con su fisiopatología como por la detección de autoanticuerpos en particular el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC). No se ha identificado, sin embargo, un autoantígeno artritogénico específico relacionado con la enfermedad y aunque existen modelos animales de poliartritis crónica inducidos artificialmente por antígenos, que tienen similitudes fenotípicas con la AR, la importancia directa de dichos modelos ha sido difícil de demostrar [4].

Se han identificado diferentes factores ambientales y genéticos involucrados en la patogenia de la AR, los cuales pueden variar de una población a otra. Es una enfermedad compleja, que se presenta en individuos genéticamente susceptibles desencadenada por estímulos ambientales. Los factores genéticos y ambientales relacionados con la AR no han sido totalmente esclarecidos y la contribución de

cualquiera de estos es necesaria pero no suficiente para la expresión completa de la enfermedad [5].

## **1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de AR**

### **1.2.1 Componente genético**

Estudios realizados en gemelos demuestran el componente genético de la enfermedad. Las tasas de concordancia llegan al 30% en gemelos monocigóticos y al 5% en gemelos dicigóticos. Se estima que el componente genético de la AR supone un 60% entre los factores desencadenantes de la enfermedad.

Al igual que otras enfermedades autoinmunes desde el punto de vista genético la AR es una enfermedad compleja, su herencia no obedece las leyes mendelianas y es poligénica [6, 7].

1.2.1.1 Genes de los antígenos leucocitarios humanos. (HLA-*human leucocyte antigens*). El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es la región del genoma que ha demostrado la asociación más fuerte y consistente con la AR en diferentes poblaciones [8].

El MHC es un complejo de genes, la mayoría con funciones inmunorreguladoras, cuyo haplotipo extendido cubre 7,6 Mb sobre el brazo corto del cromosoma 6

(6p21.3). Está subdividido en tres regiones desde el telómero hasta el centrómero, denominadas clase I, clase III y clase II. En ésta última se encuentran los loci que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que forman las moléculas de los HLA de clase II, HLA-DR, -DP y -DQ. La función primordial de las moléculas de HLA es la presentación de antígenos a las células T, en la sinapsis inmunológica que inicia la respuesta inmune adaptativa [9, 10].

Se calcula que un tercio de la influencia genética de la enfermedad está representada por los polimorfismos en el gen que codifica la cadena  $\beta$  de la molécula de HLA-DR (HLA-DR $\beta$ 1). Diferentes alelos HLA-DRB1 se han asociado a la enfermedad en poblaciones étnicamente diversas y fueron unificados en 1987 por P. Gregersen bajo la hipótesis del “epítoto compartido” (*SE-shared epitope*). El SE es una secuencia de aminoácidos (QRRAA, RRRAA ó QKRAA) ubicados de la posición 70 a la 74 de la tercera región hipervariable de la cadena  $\beta$  de la molécula HLA-DR, en la fosa de anclaje de los péptidos compartida por los alelos asociados con la AR [11, 12].

Se han sugerido algunas hipótesis para explicar la asociación del SE con la enfermedad. La primera es que estos alelos podrían presentar un mismo antígeno, pudiendo ser este un autoantígeno artritogénico (colágeno tipo 2, péptidos citrulinados) que desencadena la enfermedad [13]. Otra posible explicación es el mimetismo molecular entre péptidos de proteínas microbianas y el SE que podrían ser presentados durante el desarrollo tímico de la célula T, haciendo una selección positiva de linfocitos autorreactivos.

1.2.1.2 Genes no-HLA. La hipótesis del SE no explica toda la susceptibilidad genética de la enfermedad, pues a pesar de la robustez de la asociación con el locus DRB1, el riesgo absoluto de desarrollar AR en individuos portadores de alelos codificantes para el SE es relativamente bajo. Se ha reportado que hasta el 30% de la población normal caucásica es positiva para HLA-DRB1\*04, lo que indica que la presencia del SE no es necesaria ni suficiente para desarrollar la enfermedad [7, 8].

Durante la última década se han identificado otros genes candidatos no-HLA, asociados con un aumento del riesgo de desarrollar AR, mediante estudios de asociación genética y mapeo genético. Todos ellos están implicados en funciones inmunológicas como reconocimiento antigénico (TLRII), quimiotaxis, señalización intracelular (PTPN22, NFKBIL1), citoquinas (TNF, IL6), factores de crecimiento, ligandos celulares, moléculas de adhesión (ICAM1) y factores de transcripción (RUNX1), entre otros [14].

La mayoría de las asociaciones publicadas son relevantes en ciertos grupos étnicos. Esto puede ser debido a sesgos en los diseños de los estudios de asociación pero, al menos en parte, podría explicarse por la heterogeneidad genética de la enfermedad. Diferentes alelos, incluso diferentes genes, pueden ocasionar la susceptibilidad a la enfermedad en diferentes grupos étnicos. La asociación más robusta descrita para un gen no-HLA en población caucásica, ha sido con la variante 620W del gen PTPN22. Esta variante implica la ganancia de función de la fosfatasa de tirosina N22, que actúa como regulador negativo en la

señalización del TCR (TCR *T cell receptor*), duplica el riesgo de padecer AR seropositiva en pacientes heterocigotos y lo cuadruplica en pacientes homocigotos [15-17].

## **1.2.2 Factores ambientales**

1.2.2.1 Tabaquismo. El tabaco es el factor de riesgo ambiental asociado a la AR más ampliamente estudiado y reconocido, su implicación fue descrita por primera vez en 1987 por Vasey et al. al observar inesperadamente la asociación del tabaco con la AR cuando estudiaban el efecto de los anticonceptivos en la enfermedad [18]. En los años 90 se publicó un estudio con más de 50.000 sujetos, en el que se observó un aumento del riesgo de desarrollar AR seropositiva en fumadores activos (RR 3,8/ IC 2-6,9) y exfumadores (RR 2,61/ IC 1,3-5,3), en comparación con no fumadores [19]. Desde entonces esta asociación ha sido reproducida y confirmada por múltiples estudios [20, 21]. El consumo de tabaco está selectivamente asociado a un aumento del riesgo de desarrollar AR seropositiva más agresiva [20, 22-26].

Existe una interacción entre los factores genéticos relacionados con la AR y el tabaquismo, ya que se ha demostrado que fumar aumenta el riesgo de tener anti-PCC solo en los pacientes con AR portadores de los alelos del SE [27-31].

En una cohorte sueca se observó que el riesgo relativo de desarrollar AR seropositiva era de 2,4 (IC95%: 1,4-4,2) en pacientes heterocigotos para el SE y 4,2 (IC95%, 2.1-8,3) en pacientes homocigotos, en relación a aquellos pacientes no portadores del SE. En los fumadores este riesgo aumenta a 5,5 (IC95%: 3-10) en pacientes heterocigotos y a 15,7 (IC95%: 7,2-34,2) en pacientes homocigotos. Ni el tabaco, ni el SE, ni la combinación de ambos factores se asociaron a un mayor riesgo de AR seronegativa [29].

### **1.3 Transición a la enfermedad clínica: posibles mecanismos de iniciación de la artritis.**

Han pasado más 30 años desde que Stastny comunicó por primera vez la asociación del SE con la AR y a pesar de los avances en el conocimiento de los diferentes factores de riesgo implicados con la enfermedad, se desconoce la relación que existe entre estos factores y los eventos desencadenantes de la enfermedad [32].

Durante los años precedentes a la aparición de los síntomas se han observado cambios en una variedad de marcadores inmunológicos en el suero de estos pacientes como la presencia de FR, anti-PCC, reactantes de fase aguda y diferentes citoquinas, pero el mecanismo preciso que permite la transición de esta autoinmunidad sistémica a una localización específica en la membrana sinovial es desconocido [33-38].

### **1.3.1 Alteraciones inmunológicas preclínicas**

1.3.1.1 Factor reumatoide. La idea de que en la AR existen respuestas inmunitarias aberrantes contra autoantígenos se acepta desde el descubrimiento del FR en la sangre de pacientes con la enfermedad. Inicialmente descrito por Waaler, no fue hasta mediados de la década de 1950 que Kunkel et al. establecieron que el FR es un autoanticuerpo [39-41]. Este anticuerpo está dirigido contra determinantes antigénicos en el fragmento cristalizante (Fc) de las moléculas de inmunoglobulinas G (IgG). Puede estar presente en individuos sanos y se detecta en una proporción significativa de pacientes con otras enfermedades inflamatorias reumáticas, linfoproliferativas o infecciosas.[42-45]

El FR asociado con la AR es específico de la IgG humana, tiene mayor afinidad y puede ser de los isotipos IgM, IgG, IgA e IgE. La especificidad del FR de los pacientes con AR es mayor para la subclase de IgG3 [46]. En los análisis de la estructura cristalina de los inmunocomplejos FR-IgG, se ha demostrado que el determinante antigénico específico al que están dirigidos estos anticuerpos parece estar ubicado en la hendidura entre los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de la Fc de la IgG [47-49].

Existen varias hipótesis para explicar cómo puede la IgG humana volverse inmunogénica. Podría deberse a:

1. La exposición de nuevos determinantes antigénicos al formarse inmunocomplejos entre la IgG y su antígeno específico
2. Anomalías estructurales en la IgG propias de los pacientes con AR.
3. Modificaciones postraduccionales de la IgG como la galactosilación [50].

Hasta el 90% de los pacientes con AR son seropositivos para el FR cuando se utiliza una prueba de ELISA [51]. En estudios longitudinales como los realizados en nativos americanos que tienen un alto riesgo de padecer AR, se ha demostrado que la producción de FR con frecuencia precede durante muchos años al inicio de la enfermedad [33, 35, 52]. Los niveles de FR sérico se han asociado a un peor pronóstico [53]. La presencia de FR de isotipo IgG e IgA se asocia con una enfermedad rápidamente progresiva, erosiva y con manifestaciones sistémicas como vasculitis [54-57].

La producción prolongada de FR favorece la disregulación inmunitaria y la inflamación articular. En la membrana sinovial de los pacientes con AR se han encontrado linfocitos B específicos para el FR y en el líquido sinovial de estos pacientes hay grandes cantidades de FR e inmunocomplejos. Estos inmunocomplejos facilitan la fijación y la activación del complemento con la liberación resultante de péptidos quimiotácticos [58-60].

1.3.1.2 Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados. En 1964, Nienhuis y Mandema describieron los anticuerpos anti-factor perinuclear (APF-*antiperinuclear*

*factor antibodies*) dirigidos contra los gránulos perinucleares de células epiteliales de la mucosa oral humana y más adelante, en 1979, Young describió los anticuerpos antiqueratina (*AKA-antikeratin antibodies*) [61, 62]. Estos anticuerpos mostraban una gran especificidad para clasificar pacientes con AR, pero, la identidad de los antígenos a los que iban dirigidos fue desconocida durante muchos años.

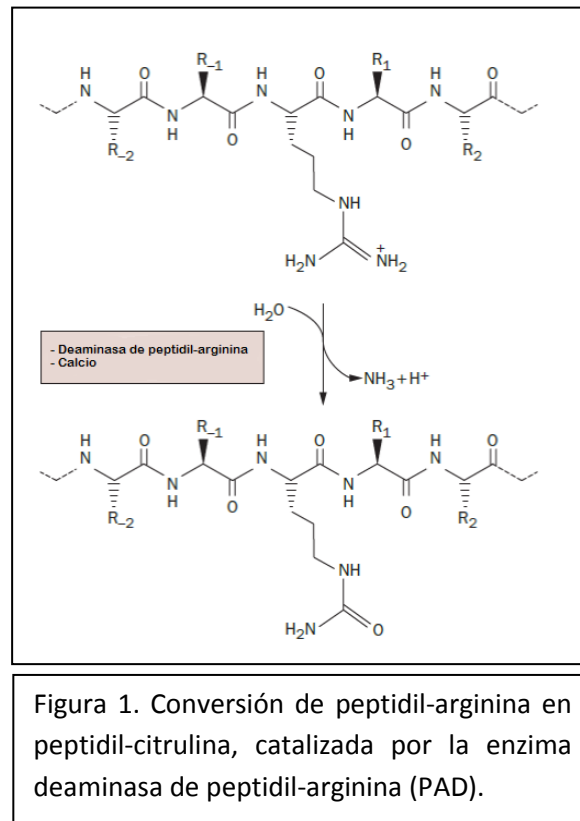
En 1995, Sebbag et al. demostraron que la proteína filagrina era el antígeno común al que estaban dirigidos estos los APF y los AKA [63]. Estudios moleculares posteriores revelaron que estos anticuerpos no se dirigían contra toda la molécula de filagrina, sino que reconocían específicamente ciertos fragmentos citrulinados dentro de la molécula [64].

La citrulinización es un proceso fisiológico que ocurre casi exclusivamente en las células que sufren apoptosis o necrosis, y consiste en la conversión postrasduccional de la peptidil-arginina en peptidil-citrulina, catalizada por la enzima deaminasa de peptidil-arginina (PAD) que es dependiente de calcio [65].

Figura 1.

Durante la muerte celular la membrana permite la entrada ilimitada de calcio dentro de la célula, activando esta enzima. Como efecto de la citrulinización las proteínas pierden la carga positiva, lo que conlleva a la pérdida de su estructura y de las interacciones con otras moléculas, facilitando la degradación por proteasas.

Este proceso no es exclusivo de las células sinoviales ni de la AR y la presencia de proteínas citrulinadas no implica la formación de anti-PCC en todos los individuos [66, 67]. Su producción parece estar fuertemente asociada al componente genético de los pacientes con AR, principalmente a la presencia del SE.



Los anti-PCC son positivos en el 70-80% de los pacientes con AR y son altamente específicos de la enfermedad. Se ha demostrado la presencia de anti-PCC en concentraciones bajas y con reactividad limitada en el suero de los pacientes hasta 20 años antes del desarrollo de la AR [33, 35]. En los años

precedentes a la aparición de los primeros síntomas se produce un aumento tanto de los niveles séricos, del perfil de epítopes reconocidos y del cambio de isotipo de estos anticuerpos, esto se traduce en una potenciación de la respuesta inmunológica, ya que diferentes isotipos de un mismo anticuerpo activan el sistema inmune por diferentes vías y el aumento de los epítopes reconocidos conlleva una diversificación de la respuesta humoral [68-71].

La fuerte asociación de los anti-PCC con la AR y la eficacia que tiene la terapia de depleción selectiva de células B en pacientes con AR seropositiva, sugiere que estos autoanticuerpos tiene un papel principal en la patogénesis de la enfermedad [72-74]. Sin embargo, el mecanismo preciso que da comienzo a la enfermedad es desconocido.

Para ser efectivos los anticuerpos deben activar diferentes mecanismos efectores inmunológicos, mediante la activación del sistema del complemento o la activación de células con receptores para la fracción constante (Fc) de las Ig. El sistema de complemento puede ser activado por la vía clásica, la de las lectinas y la vía alterna. Cada vía es activada por una molécula de reconocimiento específica inicial, pero las funciones efectoras de las tres vías convergen en la formación de la convertasa de C3, compuesta de diferentes subunidades del sistema de complemento. Esta convertasa cataliza el C3 para producir fragmentos de complemento biológicamente activos. Los anti-PCC pueden activar el complemento por la vía clásica y alterna [75]. Además de la activación del complemento, los anti-PCC pueden activar las células de sistema inmune que

poseen receptores para la Fc de las Ig. Clavel et al. demostraron que los inmunocomplejos formados por anti-PCC, inducen la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF-*tumoral necrosis factor*) por los macrófagos, vía activación del receptor FcyRIIIa en la superficie de estas células [76].

#### **1.4 Interacciones entre factores genéticos, serológicos y ambientales**

Las posibles interacciones entre los factores de riesgos ambientales y genéticos involucrados en la patogenia de la AR fueron sugeridas por primera vez en el 2004, cuando se observó que la asociación entre el tabaquismo y la AR era mayor en los pacientes que eran portadores de alelos del SE. Resulta interesante que la asociación del tabaco es selectiva para la AR seropositiva y que fumar aumenta el riesgo de tener anti-PCC solo en los pacientes con AR portadores de los alelos del SE [29].

Se postula que la exposición al tabaco induce una reacción inflamatoria y necrosis celular, favoreciendo la citrulinización de proteínas en la mucosa pulmonar. En lavados broncoalveolares de fumadores se observa un aumento significativo tanto de la expresión de la enzima PAD, como de la presencia de péptidos citrulinados, comparado con los no-fumadores [77]. En presencia de factores genéticos de susceptibilidad, la citrulinización pulmonar de proteínas podría facilitar el desarrollo de una respuesta autoinmune local con la subsecuente producción de anti-PCC [30, 78]. Figura 2.

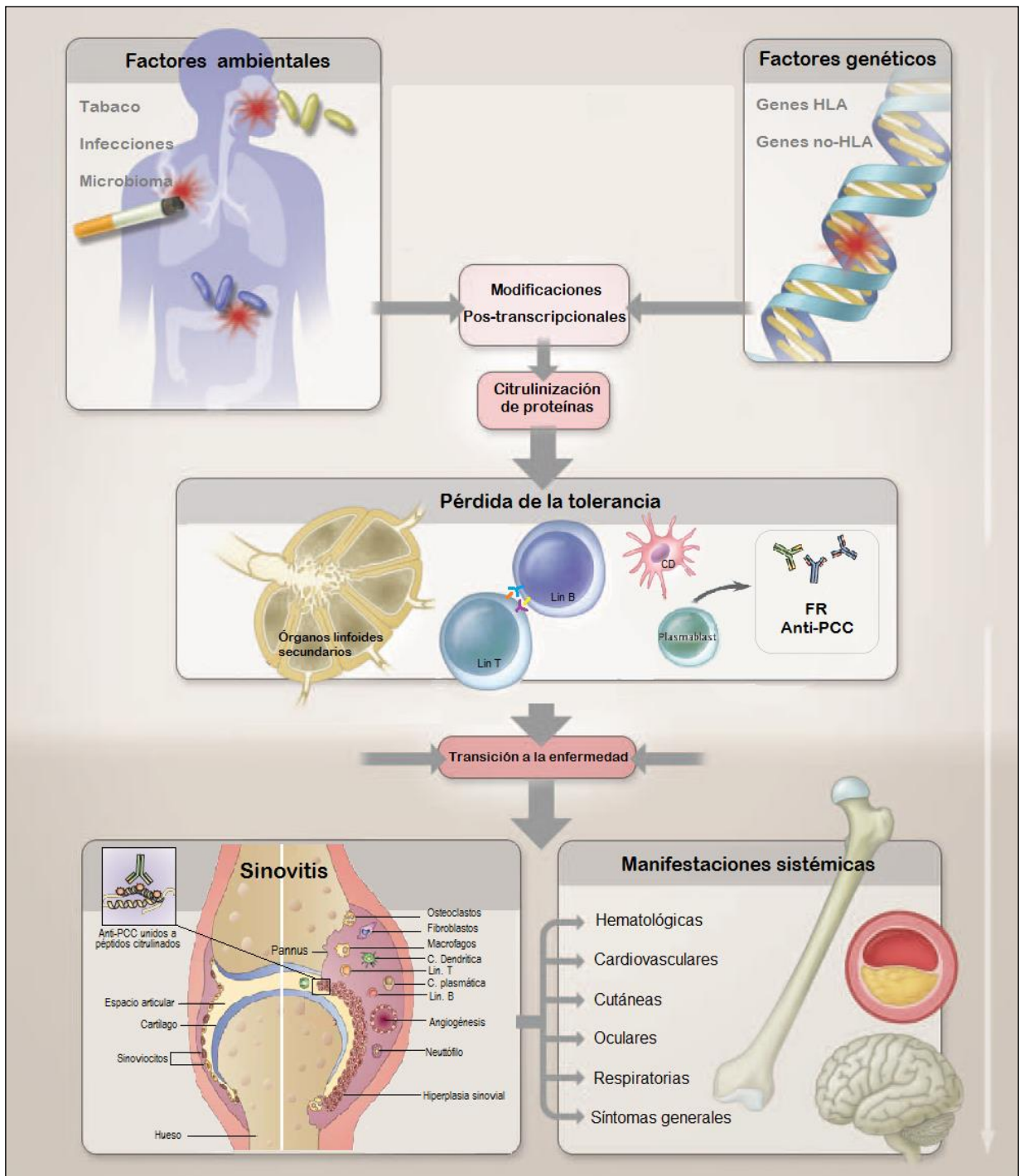


Figura 2. Esquema de la interacción entre los diferentes factores ambientales y genéticos asociados a la AR y la transición a la enfermedad clínica.

La localización del SE dentro de la fosa de anclaje al péptido de las moléculas de HLA lo involucra directamente en la presentación antigénica. Los péptido citrulinados se unen con mayor avidéz a la fosa de anclaje de las moléculas de HLA pertenecientes al SE favoreciendo la presentación antigénica a células efectoras de la respuesta inmune adaptativa y desencadenando la producción de anticuerpos [13, 79].

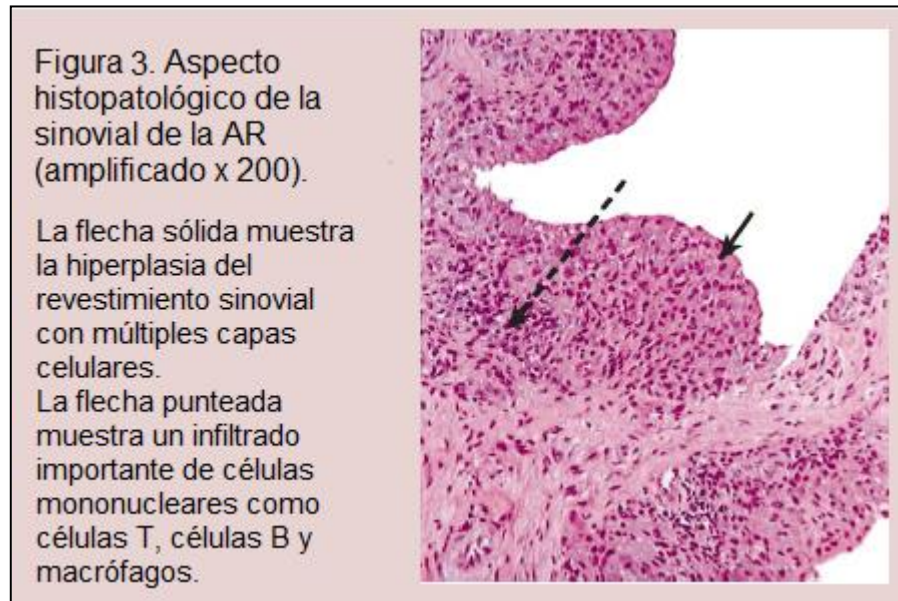
Por otra parte, el SE polariza la diferenciación de los linfocitos T hacia el tipo TH17, que se han asociado con autoinmunidad [80]. Sin embargo, todavía no es claro cómo esta pérdida de tolerancia sistémica se localiza y desencadena la enfermedad en las articulaciones.

### **1.5 Inflamación de la membrana sinovial**

El revestimiento sinovial en la articulación normal es de una o dos capas de células. Se encuentran dos células principales en el revestimiento, una célula tipo macrófago conocida como sinoviocito A y una célula tipo fibroblasto conocida como sinoviocito B.

Los rasgos histopatológicos característicos de la AR son la hiperplasia celular con un aumento porcentual de sinoviocitos tipo A, la angiogénesis y la infiltración sinovial por células mononucleares.

Los linfocitos T constituyen alrededor del 50% o más de las células de la membrana sinovial de la AR y la mayoría son CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos B constituyen sólo un 5% y se encuentran, principalmente, en centros linfoides reactivos [81].



### 1.5.1 Sistema inmune adaptativo

1.5.1.1 Linfocitos T. El aspecto histopatológico de la AR, caracterizado por una infiltración sinovial exuberante de linfocitos T, se destaca como prueba de que estas células tienen un papel principal en su patogénesis. El bloqueo de la coestimulación de la célula T con la proteína de fusión CTLA4-Ig (abatacept) ha demostrado eficacia en el tratamiento de la AR, confirmando el papel de la activación de las células T en la patogénesis de la enfermedad [82]. Sin embargo, en varios ensayos clínicos se han probado tratamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de las células T, como anti-CD4,

anti-CD5 y anti-CD52, observando respuestas clínicas muy modestas a pesar de obtener una linfopenia profunda y a veces prolongada [5, 83, 84].

La AR ha sido considerada históricamente una enfermedad mediada por linfocitos T colaboradoras de tipo 1 (Th1), aunque en los últimos años hay evidencias de la implicación de los linfocitos Th17 en la patogénesis de la enfermedad. También han sido detectadas células T reguladoras naturales (T reg) en la membrana sinovial y líquido sinovial de pacientes con enfermedad activa [85, 86].

Los linfocitos T de la sinovial de la AR presentan un fenotipo de superficie activado, con una elevada expresión de moléculas coestimuladoras. Los linfocitos T activados median funciones efectoras mediante la liberación de citoquinas, activación de leucocitos y células mesenquimales.

Las células T CD4+ CD27+ proporcionan ayuda a las células B para que puedan aumentar la producción de anticuerpos en la sinovial. La molécula coestimuladora CD28 presente en la superficie de los linfocitos T se une a sus ligandos CD80 y CD86 en la superficie de células presentadoras de antígeno, como los macrófagos tisulares y las células dendríticas, que procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T a través de las moléculas de HLA, para la activación de estas células. Además, los linfocitos T producen una activación no antígeno-específica de células efectoras como macrófagos y fibroblastos a través de la vía CD40-CD40 ligando [87-89].

1.5.1.2 Linfocitos B. La participación de las células B y las células plasmáticas sinoviales en la iniciación y perpetuación de la AR es sugerida indirectamente por la eficacia de los tratamientos dirigidos contra las células B en el control de la enfermedad, tal es el caso del anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) [73].

Las células B sinoviales se encuentran en folículos linfoides diferenciados dentro de la sinovial conocidos como centros germinales. La formación de estas estructuras se produce bajo la influencia de varias citoquinas solubles y unidas a la membrana como el factor estimulador de los linfocitos B (BlyS) molécula clave que regula la diferenciación de las células B, el ligando inductor de la proliferación (APRIL) y quimioquinas como la CXCL13. En los centros germinales se forman agregados entre linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y células plasmáticas. No está claro si funcionan como órganos linfoides ectópicos que realiza funciones inmunitarias normales o si están relacionados con la autoinmunidad. La presencia de abundantes células productoras de autoanticuerpos en ellos, respalda esta última hipótesis. La membrana sinovial de la AR está poblada de células-B que producen FR, anticuerpos contra el colágeno tipo II y anti-PCC [90-94].

La formación de centros germinales favorece la interacción celular, el linfocito B que provee señales al linfocito T mediante la presentación de antígenos y el linfocito T ayuda a la célula B a completar su maduración a través de citoquinas y ligandos de membrana. La interacción bidireccional entre estas dos células crea un círculo vicioso en el cual un evento desencadenante de autoinmunidad en cualquiera de los dos compartimentos celulares se perpetuaría por

retroalimentación [95]. Sin embargo, el evento desencadenante y la célula responsable de iniciar esta respuesta son desconocidos.

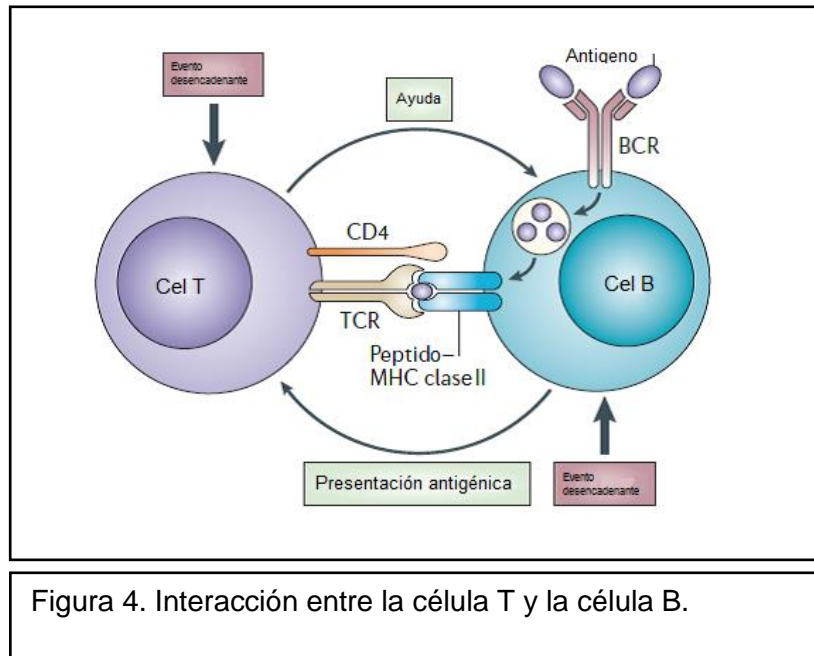


Figura 4. Interacción entre la célula T y la célula B.

### 1.5.2 Sistema inmune innato

En la membrana sinovial de la AR hay una gran variedad de células del sistema inmune innato, como macrófagos, mastocitos, células NK (NK: *natural killers*) y neutrófilos [96]. Los macrófagos son unas de las principales células efectoras en la sinovitis actúan como células fagocíticas y presentadoras de antígenos a los linfocitos T y liberan diferentes citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1,6,12,15,18 y 23), radicales libres de oxígeno, intermediarios del nitrógeno y metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular [97]. La activación de estas células también es

mediada por citoquinas, interacciones con linfocitos T e inmunocomplejos entre otros. Los neutrófilos contribuyen a la sinovitis liberando prostaglandinas, proteasas y radicales libres de oxígeno [98]. Las células NK juegan un papel inmunorregulador ya que pueden estimular las células B para producir FR [99].

## **1.6 Aspectos clínicos de la artritis reumatoide**

La AR es una enfermedad heterogénea en su expresión clínica, evolución y respuesta al tratamiento. Esta complejidad se extiende a los marcadores biológicos asociados a la enfermedad (reactantes de fase aguda, autoanticuerpos, factores genéticos) siendo el diagnóstico una combinación de los hallazgos clínicos y de laboratorio.

### **1.6.1 Manifestaciones clínicas**

La manifestación clínica principal de la enfermedad es la artritis que suele ser poliarticular y simétrica. Las articulaciones afectadas más frecuentemente son las metacarpofalángicas (MCF), las interfalángicas proximales (IFP), los carpos y las metatarsofalángicas (MTF), aunque la inflamación puede localizarse en cualquier articulación sinovial [81].

Si excluimos la anemia, las manifestaciones extra-articulares aparecen en aproximadamente el 15-25% de los pacientes con AR. En general, el número y la

gravedad de estas manifestaciones varían según la duración y la gravedad de la enfermedad y se asocian a una mayor morbimortalidad [100]. Las principales manifestaciones extra-articulares se describen en la tabla 1.

Órgano/sistema	Tipo de manifestación
Piel	Nódulos reumatoides
Ojos	Queratoconjuntivitis seca, escleritis, epiescleritis
Hematológico	Anemia
Respiratorio	Pleuritis, neumonitis, fibrosis intersticial, nódulos
Cardiovascular	Pericarditis, miocarditis, vasculitis reumatoide

Tabla 1. Manifestaciones extra-articulares de la AR

### 1.6.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la AR se basa en síntomas y signos clínicos, con el apoyo de ciertos parámetros de laboratorio. No existe un parámetro clínico o de laboratorio con el que se pueda realizar un diagnóstico definitivo. Diferentes comunidades científicas han establecido criterios de clasificación para la AR con el fin de unificar la investigación en reumatología.

Los criterios de clasificación más recientes fueron publicados en septiembre de 2010 por EULAR (European League Against Rheumatism) y el ACR (American College of Rheumatology). Tabla 2.

<i>Afectación articular</i>	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
<i>Serología</i>	
FR y anti-PCC negativos	0
FR y/o anti-PCC positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o anti-PCC positivos alto (> 3 VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
<i>Duración</i>	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1
Tabla 2. Criterios de clasificación de la AR	

Un paciente será clasificado de AR si la puntuación total es igual o mayor a 6 [101, 102]. Estos criterios no impiden a los médicos realizar el diagnóstico de AR en aquellos pacientes con presentación inusual.

## **1.7 Tratamiento**

El tratamiento y el objetivo terapéutico de la AR han cambiado drásticamente durante los últimos años con los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de las terapias biológicas. Existen dos líneas fundamentales en el tratamiento, los fármacos destinados al control de la sintomatología (analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos y corticoides) y los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) sintéticos y biológicos [103].

### **1.7.1 FAME sintéticos**

En la tabla 3 se enumeran los principales FAME sintéticos utilizados en la AR y mecanismo de acción de principal.

FAME sintéticos	Mecanismo de acción principal
Metotrexato	Inhibe la síntesis de purina y timidato
Leflunomida	Inhibe la síntesis de <i>de novo</i> de pirimidina
Sulfasalazina	Inhibe la vía de la lipoxigenasa del ácido araquidónico.
Hidroxicloroquina	Altera el ensamblaje de las moléculas HLA clase II

Tabla 3. FAME sintéticos y su mecanismo de acción principal

## 1.7.2 FAME biológicos

1.7.2.1 Bloqueadores del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Los primeros FAME biológicos utilizados en la AR fueron los bloqueadores del TNF- $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ). Actualmente existen 5 fármacos anti-TNF- $\alpha$  aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) para el tratamiento de la AR [104]. Figura 5 y 6.

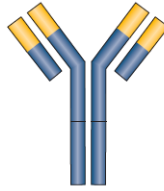
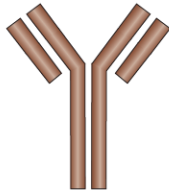
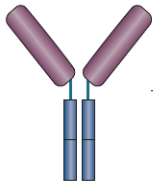
<p>Infliximab (IFX): Anticuerpo (Ac) IgG1 monoclonal quimérico dirigido contra el TNF-<math>\alpha</math>, fue el primer Ac monoclonal diseñado para el tratamiento de la AR, la Fc del Ac es de origen humano y las variables (Fab) de origen murino.</p>	
<p>Adalimumab (ADA): Ac IgG1 monoclonal humano recombinante expresado en células de Ovario de Hámster Chino a través de fagos.</p>	
<p>Etanercept (ETN): Proteína humana compuesta por el receptor p75 del TNF-<math>\alpha</math> y la porción Fc de la IgG1 humana, obtenida por tecnología de ADN recombinante.</p>	

Figura 5. Fármacos anti-TNF- $\alpha$ .

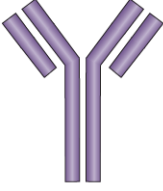
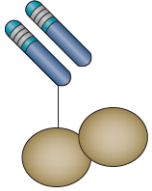
<p>Golimumab (GOL): Anticuerpo monoclonal IgG1 humano producido en una línea celular de hibridoma murino mediante tecnología de ADN recombinante</p>	
<p>Certolizumab pegol (CZP): fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal murino humanizado contra el TNF-<math>\alpha</math> humano conjugado con dos moléculas de polietilenglicol (PEG)</p>	

Figura 6. Fármacos anti-TNF- $\alpha$ .

1.7.2.2 Otros FAME biológico. En la tabla 4 se enumeran otros FAME biológicos usados en AR y su mecanismo de acción principal [105].

FAME biológicos	Mecanismo de acción
Abatacept	Inhibidor de la coestimulación de la cél T
Tocilizumab	Bloqueador de IL-6
Rituximab	Depleción de las células B

Tabla 4. Otros FAME biológicos.

## **1.8 Recomendaciones para el tratamiento de la AR**

En la figura 7 se ilustra el algoritmo de las actuales recomendaciones EULAR para el tratamiento de la AR.

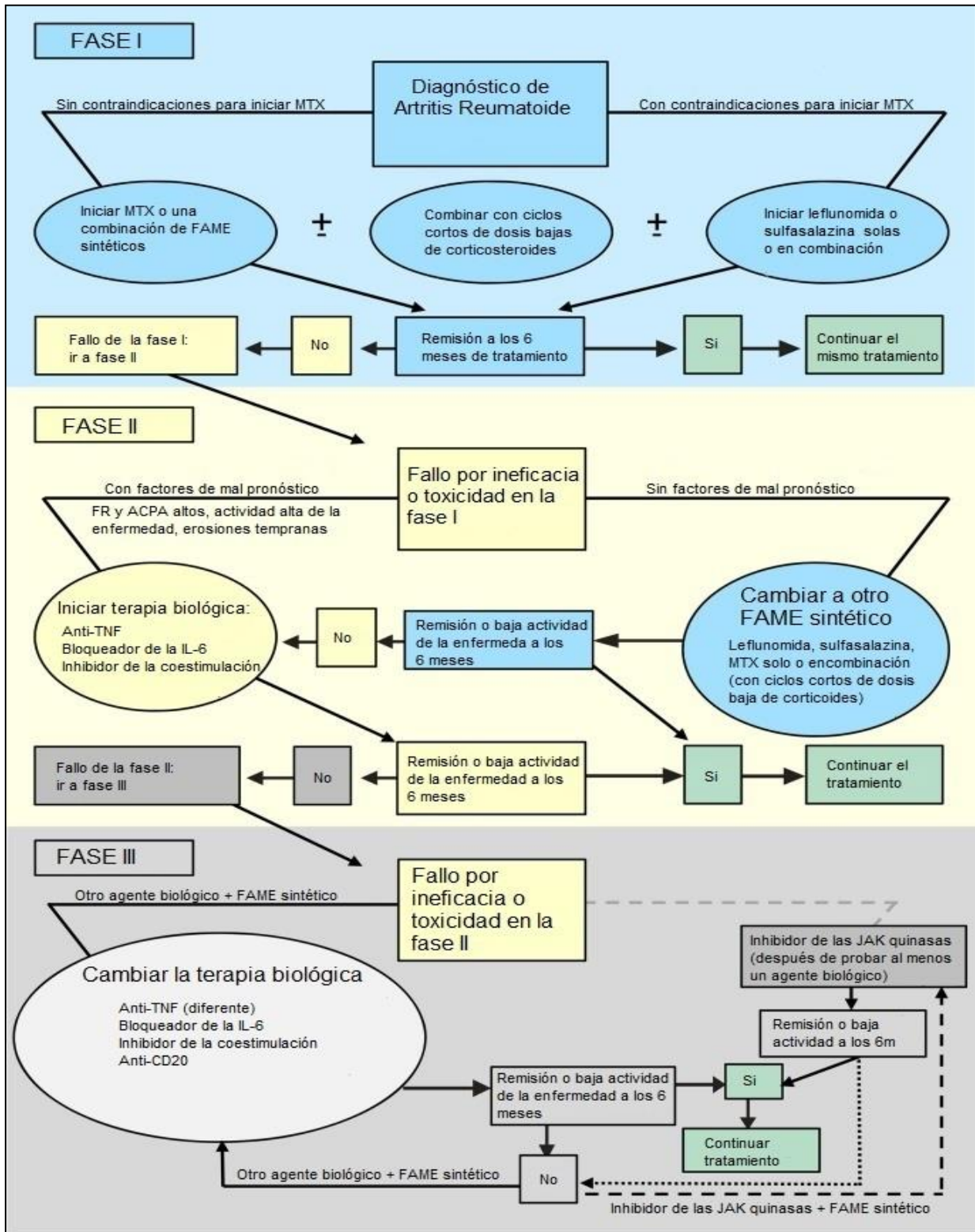


Figura 7. Guías de recomendación EULAR para el manejo de la AR

El objetivo principal del tratamiento es conseguir la remisión completa de la enfermedad o la mínima actividad inflamatoria posible, para lo que es fundamental evitar retrasos en el diagnóstico y en el inicio del tratamiento con FAME [103].

## **1.9 Seguimiento de la enfermedad**

La introducción de los FAME biológicos y la creación de guías de recomendaciones para el tratamiento han significado un gran cambio en el control de la AR, sin embargo, una cantidad sustancial de pacientes no responden, persisten con actividad de la enfermedad o presentan recaídas a pesar del tratamiento.

La creación de estrategias para el seguimiento de la enfermedad tanto clínicas, como con marcadores biológicos se ha convertido en uno de los principales retos en la investigación de esta enfermedad.

### **1.9.1 Actividad inflamatoria**

La evaluación de la actividad de la enfermedad es fundamental para valorar la respuesta al tratamiento y tomar decisiones terapéuticas. El grado de actividad se establece mediante el recuento de articulaciones dolorosas y tumefactas, la valoración del dolor, la valoración global de la enfermedad por el paciente y por el médico y la determinación de reactantes de fase aguda [106].

Con el fin de realizar un seguimiento cuantitativo y reproducible de la actividad de la enfermedad, se han creado índices que unifican estos parámetros clínicos y analíticos como el DAS28 (*Disease Activity Score based in 28 joints*) o el SDAI (*Simplified Disease Activity Index*).

1.9.1.1 Recuentos articulares. Se basan en la cuantificación de la presencia o ausencia de dolor (número de articulaciones dolorosas) y tumefacción (número de articulaciones tumefactas). Existen varias modalidades de recuentos, el recuento articular completo consiste en la exploración de 68 articulaciones para el dolor y de 66 para la tumefacción (se excluye la cadera), es el que ofrece mayor información, sin embargo, consume más tiempo que los recuentos simplificados como el de 28 articulaciones [107]. Este último es el que se utiliza para el cálculo de los índices combinados (DAS28, SDAI). En la figura 8 se ilustran las 28 articulaciones.

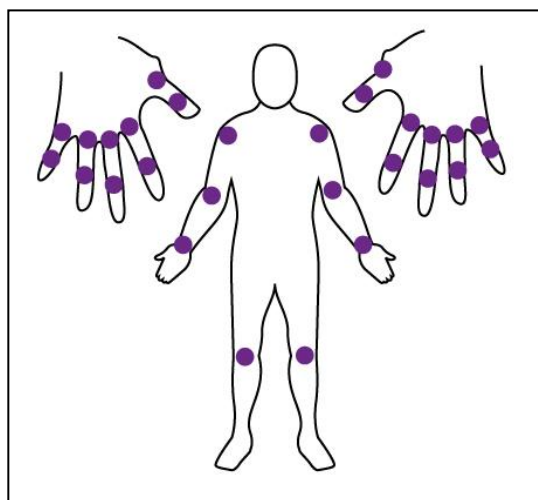


Figura 8. Esquema de las 28 articulaciones incluidas en el DAS28.

1.9.1.2 Evaluación del dolor. El dolor debe ser evaluado por el propio enfermo. Se recomienda su medición con una escala visual analógica horizontal de 10 segmentos con marcas verticales del 0 al 10 e indicadores en los extremos que marquen ningún dolor (0) y máximo dolor (10) [108, 109].

1.9.1.3 Evaluación global de la enfermedad. La evaluación global de la enfermedad se realiza desde el punto de vista del médico y del enfermo. Para su medición se usa una escala visual analógica horizontal como la usada en la evaluación del dolor [110].

1.9.1.4 Reactantes de fase aguda. Su medición es de gran ayuda en el seguimiento de los procesos inflamatorios en general y articulares en particular. Sus valores están asociados a la intensidad de la inflamación subyacente. En el organismo existen diversos reactantes de fase aguda pero, en la práctica, los más utilizados son la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR). Ambos parámetros están incluidos en las recomendaciones del ACR y han mostrado una utilidad parecida en la evaluación de la actividad inflamatoria [111]. Se ha observado, además, una relación entre los niveles elevados de los reactantes de fase aguda, especialmente de la PCR y un peor pronóstico de la enfermedad [112, 113]

### 1.9.2 Índices de actividad.

Resumen la información de varios parámetros en un solo indicador útil y válido en la evaluación de la actividad de la enfermedad. Se han publicado diferentes índices compuestos, como el DAS (*Disease Activity Score*), el SDAI (*Simplified Disease Activity Index*) o el CDAI (*Clinical Disease Activity Index*). Estos índices difieren en el número de parámetros incluidos y en los métodos utilizados para su cálculo. Sus ventajas respecto a la evaluación convencional con parámetros aislados son evitar la duplicidad y aumentar la sensibilidad al cambio.

El índice más usado y recomendado por EULAR es el DAS28 que incluye el número de articulaciones dolorosas y tumefactas sobre 28 articulaciones, la VSG o la PCR y la evaluación global de la salud efectuada por el paciente sobre una escala analógica visual. Los valores DAS28 varían entre 0 – 10 [114, 115].

El SDAI no necesita una fórmula matemática compleja para su determinación, se calcula mediante una simple suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, la valoración de la actividad por el paciente y el médico medidos de 0 a 10 y la concentración de PCR en mg/dl [116].

El CDAI (Aletaha, 2005) es una modificación de SDAI, en el que no se incluye la PCR, para usarlo en los casos en los que no se puede disponer de los reactantes de fase aguda de forma inmediata o se dan en valores semicuantitativos [117].

1.9.2.1 Clasificación de la actividad inflamatoria basada en índices. La actividad inflamatoria puede variar dependiendo del paciente, del momento evolutivo o de la respuesta al tratamiento. Clásicamente se pueden diferenciar 4 tipos de actividad inflamatoria: remisión, actividad baja, moderada o alta. En la tabla 5 se describen los puntos de corte para las categorías de actividad según el DAS28, SDAI y el CDAI [118, 119].

	<b>Categoría</b>	<b>Punto de corte</b>
<b>DAS28</b>	Remisión	$\leq 2.6$
	Actividad baja	$>2.6 \leq 3.2$
	Actividad moderada	$>3.2 \leq 5.1$
	Actividad alta	$>5.1$
<b>SDAI</b>	Remisión	$\leq 3.3$
	Actividad baja	$>3-3 \leq 11$
	Actividad moderada	$>11 \leq 26$
	Actividad alta	$>26$
<b>CDAI</b>	Remisión	$\leq 2.8$
	Actividad baja	$>2.8 \leq 10$
	Actividad moderada	$>10 \leq 22$
	Actividad alta	$>22$

Tabla 5. Puntos de corte para las categorías de actividad según los diferentes índices.

### 1.9.3 Daño estructural.

El daño estructural articular se mide con técnicas de imagen. La técnica más usada es la radiografía simple articular. Existen diferentes índices que cuantifican la disminución del espacio articular y las erosiones, el más utilizado para este fin

es el de Sharp con las modificaciones de van der Heijde [120, 121]. En la última década se ha incorporado la ecografía en escala de grises (modo-B) para la valoración y monitorización de los pacientes con AR, demostrándose en diferentes estudios su superioridad con respecto a la exploración clínica para detectar sinovitis, además, el modo Doppler de alta sensibilidad (power Doppler y Doppler Color) permite evaluar la actividad inflamatoria, mediante la detección de flujo sanguíneo patológico en la membrana sinovial que se ha relacionado con la progresión radiológica de la AR [122-124].

#### **1.9.4 Niveles séricos del fármaco y anticuerpos anti-fármaco**

La pérdida de eficacia del tratamiento, principalmente a los fármacos anti-TNF- $\alpha$ , ha sido asociada a la producción de anticuerpos contra el fármaco, comúnmente llamados ADAb (anti-drug antibodies).

La formación de ADAb puede reducir la eficacia del tratamiento mediante dos mecanismos. En primer lugar, los ADAb pueden ser anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el sitio activo de la proteína terapéutica y por lo tanto inhiben la unión del fármaco a su diana. En segundo lugar, la unión de ADAb neutralizantes y/o no neutralizantes al agente terapéutico puede ocasionar la formación de inmunocomplejos que aceleran el aclaramiento plasmático del fármaco [125, 126].

Diferentes grupos han demostrado que la aparición de estos anticuerpos en el suero de pacientes con AR tratados con anti-TNF- $\alpha$  se correlaciona de manera inversa con los niveles circulantes del medicamento y con la eficacia. Su presencia, además, se ha asociado con la aparición de efectos adversos como reacciones alérgicas e infusionales.

La prevalencia de ADA b varía considerablemente en los diferentes estudios. La tabla 6 y 7 resumen la frecuencia de ADA b, su relación con los niveles séricos del medicamento y la respuesta clínica en dichos estudios.

Tabla 6. Incidencia y asociaciones clínicas de los ADA b en los diferentes estudios.						
Autor	Tto Tpo	No de Pacientes	Método	ADA b (%)	Relación con los niveles de anti-TNF	Relación con la actividad clínica
Pascual-Salcedo [127]	IFX 400	85	ELISA	32	Asociación inversa	Asociación inversa
Finckh [128]	IFX NR	64	ELISA	10	Correlación inversa	NA
Maini [129]	IFX 26	87	ELISA	17,4	NR	NR
Haraoui [130]	IFX NR	51	ELISA	39	Asociación inversa *	NR
Bendtzen [131]	IFX 26	106	RIA	44	Correlación inversa r=-0,4 p<0,05	Asociación inversa
Wolbink [132]	IFX 56	51	RIA	43	Correlación inversa P<0,01	Inversamente asociados p=0,04
van den Bemt [133]	IFX 14	18	RIA	22,2	Asociación inversa *	NR
Radstake [134]	IFX 26	35	RIA	50	Correlación inversa P=0,01	Correlación inversa P=0,008
Bartelds [135]	ADA 28	235	RIA	20	NR	Asociación inversa P=0,001
Van de Putte [136]	ADA 26	434	ELISA	12	NR	Correlación inversa
Keystone [137]	ADA 52	419	ELISA	0,72	NR	NR
Radstake [134]	ADA 28	34	RIA	25	NR	Asociación inversa
Weinblatt [138]	ADA 24	271	ELISA	1	NR	NR
Choy [139]	CZP 24	126	NR	5	NR	NR

NR, no reportado; NA, no asociado; NS, no significativo; \*, p<0,05.

Tabla 7. Incidencia y asociaciones clínicas de los ADA b en los diferentes estudios.

Autor	Tto Tpo	No de Pacientes	Método	ADAb (%)	Relación con los niveles de anti-TNF	Relación con la actividad clínica
Fleischmann [140]	CZP 24	111	ELISA	8,1	NR	Asociación inversa
Smolen [141]	CZP 24	492	NR	5,1	NR	NR
Keystone [142]	CZP 52	982	ELISA	6,4	NR	NR
Tanaka [143]	GLM 24	269	ELISA	0	NR	NR
Weinblatt [144]	GLM 24	330	ELISA	3	Asociación inversa	NR
Smolen [145]	GLM 24	264	ELISA	3	NR	NR
Kay [146]	GLM 48	107	ELISA	6,5	Asociación inversa	NA
Keystone [147]	GLM 24	236	ELISA	2,1	NR	NR
Emery [148]	GLM 24	315	ELISA	6,3	NR	NR
Kremer [149]	GLM 24	529	ELISA	5	NR	Asociación inversa (ns)
Klareskog [150]	ETA 193	549	ELISA	5	NR	NA
Jamnitski [151]	ETA 26	292	RIA	0	NR	NR
Hoshino [152]	ETA 32	40	RIA	0	NR	NR
Keystone [153]	ETA 16	420	ELISA	3	NR	NA
Dore [154]	ETA 28	214	ELISA	5,6	NR	NA

NR, no reportado; NA, no asociado; NS, no significativo; \*, p<0,05.

Esta variabilidad puede explicarse por diferencias entre los estudios en cuanto a las características de los pacientes estudiados, la enfermedad de base, los tratamientos concomitantes, la exposición previa a proteínas similares, la posología del fármaco, el momento de tomar la muestra o la técnica de detección [155, 156]. El tipo de técnica utilizada para detectar los ADA b es una de las principales causas de esta variabilidad y es esencial que la detección proporcione datos fiables y sea reproducible.

Las técnicas más utilizadas para determinar la presencia de ADAb en fluidos biológicos son el inmunoensayo (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*, ELISA) y la radioinmunoprecipitación (*Radioimmunoprecipitation Assay*, RIA). Estas dos técnicas detectan la proporción de ADAb que se encuentran libres en el suero de los pacientes y no detectan los ADAb que están formando inmunocomplejos con el medicamento. Los ADAb sólo serían detectados si sus niveles superan los niveles de la medicación a la cual están dirigidos [157, 158].

Se han desarrollados nuevos métodos para la detección de los ADAb libres y unidos al fármaco como el PIA (*pH-shift anti-idiotypic antigen-binding test*). En esta técnica los complejos de fármaco-ADAb son disociados por medio de cambios en el pH, las moléculas de medicamento libre son bloqueadas con un anticuerpo anti-idiotipo y los ADAb libres se miden mediante RIA [159]. Sólo unos pocos estudios han evaluado la inmunogenicidad de los agentes anti-TNF- $\alpha$  utilizando esta técnica.

La estandarización de los procedimientos de laboratorio de rutina para detectar los ADAb sigue siendo un enorme reto. En la práctica clínica, por lo tanto, la medición de los niveles activos del medicamento que está libre para unirse al TNF- $\alpha$  parece ser el método más valioso para la predicción de la respuesta terapéutica [160].

## 1.9.5 Autoanticuerpos

La utilidad de medir periódicamente la concentración circulante de FR y los anti-PCC para el seguimiento de la actividad de la AR y la predicción de la respuesta al tratamiento es controvertida. En la tabla 8 se resumen los resultados de diferentes estudios que han evaluado la relación entre las concentraciones de FR y anti-PCC y la respuesta al tratamiento con anti-TNF- $\alpha$ .

Tabla 8. Relación entre la concentración de FR y anti-PCC y la respuesta a anti-TNF- $\alpha$ .

Autor	Tto	Criterio de Remisión	Tiempo	Variables	Diferencias Pre-tto entre Res y NoRes	Cambio Pos-tto
Alessandri [161]	IFX	ACR 20,50,70	0, 24 sem	FR Anti-PCC IgG	NR	Disminución en la conc de FR y anti-PCC en Res.
Atzeni [162]	ADA	ACR 20,50,70	0,6,12 sem	FR IgM Anti-PCC IgG	NR	Disminución en la conc de FR y anti-PCC en Res
De Rycke [163]	IFX	Reducción del 20% en la PCR y VSG	0, 30 sem	FR IgM Anti-PCC IgG	Conc baja de FR IgM en Res ND en el Anti-PCC	NR
Bobbio-Pallavicini [164]	IFX, ETN, ADA	Reducción del DAS28 $\geq$ 1.2	0, 1 año	FR IgA, IgM, IgG Anti-PCC IgG	Conc baja de FR IgA en Res ND en Anti-PCC	Disminución en la conc de FR en Res ND en Anti-PCC
Braun-Moscovici [165]	IFX	Reducción del DAS28 $\geq$ 1.2	0,2,6,14 sem	FR Anti-PCC IgG	Conc baja de IgG en Res. ND en FR	Disminución en la conc de anti-PCC en Res ND en FR
Nicaise- Roland [166]	IFX	NR	0, 1 año	FR IgM Anti-PCC IgG Anti-MCV	ND	Disminución en la conc de Anti-MCV y Anti-PCC en Res
Dejaco [167]	IFX, ETN, ADA	Respuesta buena o moderada EULAR	0, 24 sem	Anti-PCC (IgG)	ND	ND
Klaasen [168]	IFX	Reducción del DAS28 $\geq$ 1.2	0, 16 sem	FR IgA, IgM, IgG Anti-PCC IgA, IgM, IgG	Conc altas de FR IgM, IgG y Anti-PCC IgM en Res	Disminución en la conc de FR IgA, IgM, IG y anti-PCC IgA, IgG en Res

Sem, semanas; NR, no reportado; Conc, concentración; ND, no diferencias; Res, respondedores; NoRes, no respondedores.

La relación entre la concentración basal de estos autoanticuerpos y la respuesta al tratamiento es muy variable. Los pacientes respondedores, en general, presentan una disminución de la concentración de FR y anti-PCC, pero en dos de los estudios no hubo un descenso significativo. En los pacientes no respondedores no parece existir un patrón definido en el cambio de las concentraciones. La relación entre los cambios y la respuesta a los anti-TNF es controvertida. Ninguno de estos estudios evaluó el efecto de la concentración libre del medicamento en las concentraciones de FR y anti-PCC y su relación con la actividad de la enfermedad.

## **2. Objetivos**

## **2.1 Objetivo principal**

Estudiar el cambio de las concentraciones de FR y anti-PCC antes y después del tratamiento con un anti-TNF- $\alpha$  en sueros de pacientes con AR y su relación con la concentración sérica del fármaco.

## **2.2 objetivos secundarios**

Evaluar la relación que existe entre la actividad de la enfermedad de pacientes con AR tratados con IFX y los niveles séricos libres del fármaco.

Estudiar la relación que existe entre el desarrollo de anticuerpos anti-IFX y los niveles séricos del fármaco.

### **3. Materiales y métodos**

**3.1 Diseño:** Estudio de casos y controles anidado en una cohorte.

**3.2 Selección de pacientes:**

**3.2.1 Criterios de inclusión:**

- Edad superior a 18 años.
- Cumplir los criterios de clasificación de AR del ACR de 1987 [169].
- Haber recibido tratamiento con IFX como primera línea de terapia biológica.
- Conservar una muestra de suero pretratamiento y postratamiento en la seroteca del Servicio de Reumatología del hospital Gregorio Marañón (1998-2011).
- Firma del consentimiento informado.

**3.2.2 Criterios de exclusión:**

- Padecer otra enfermedad reumática autoinmune sistémica.

### **3.3 Variables recogidas**

#### **3.3.1 Variables demográficas:**

- Fecha de nacimiento
- Género.

#### **3.3.2 Variables epidemiológicas.**

- Fecha de inicio de los síntomas
- Fecha de diagnóstico de la enfermedad
- Fecha de inicio del tratamiento con terapias biológicas
- Fecha de suspensión del tratamiento con IFX, en los pacientes en que este tratamiento fue suspendido por ineficacia.

#### **3.3.3 Variables clínicas y analíticas.**

Se recogieron en el momento del inicio de la terapia biológica y periódicamente durante los dos años siguientes o hasta la suspensión de este tratamiento. Las variables recogidas fueron:

- Tratamiento concomitante con FAME sintéticos.
- Tratamiento concomitante con corticoides.

- Recuento de articulaciones tumefactas (28 articulaciones)
- Recuento de articulaciones dolorosas (28 articulaciones)
- Evaluación global de la enfermedad por el paciente (escala visual analógica)
- Reactantes de fase aguda (PCR y VSG)

#### **3.3.4 Variables serológicas estudiadas.**

Se determinaron por medio de ELISA los siguientes marcadores séricos:

- Concentraciones séricas de IFX.
- Concentraciones séricas de ADAb.
- Concentraciones séricas de FR isotipo IgM
- Concentraciones séricas de los anti-PCC isotipos IgA, IgM e IgG.

### **3.4 Métodos**

El diagrama del estudio se expone en la figura 9. Se obtuvieron dos muestras de suero de cada paciente estudiado. La muestra basal, tomada antes de iniciar el tratamiento con IFX, y la segunda muestra tomada entre el primer y segundo año de tratamiento con IFX o en el momento en que este era suspendido.

La actividad de la enfermedad se midió en el momento de la muestra basal y cada vez que el paciente acudía al Hospital de Día de Terapias Biológicas (HDTB) para la infusión de IFX.

La concentración de autoanticuerpos se midió en la muestra basal y en la segunda muestra. Los niveles de IFX y ADA b se midieron en la segunda muestra.

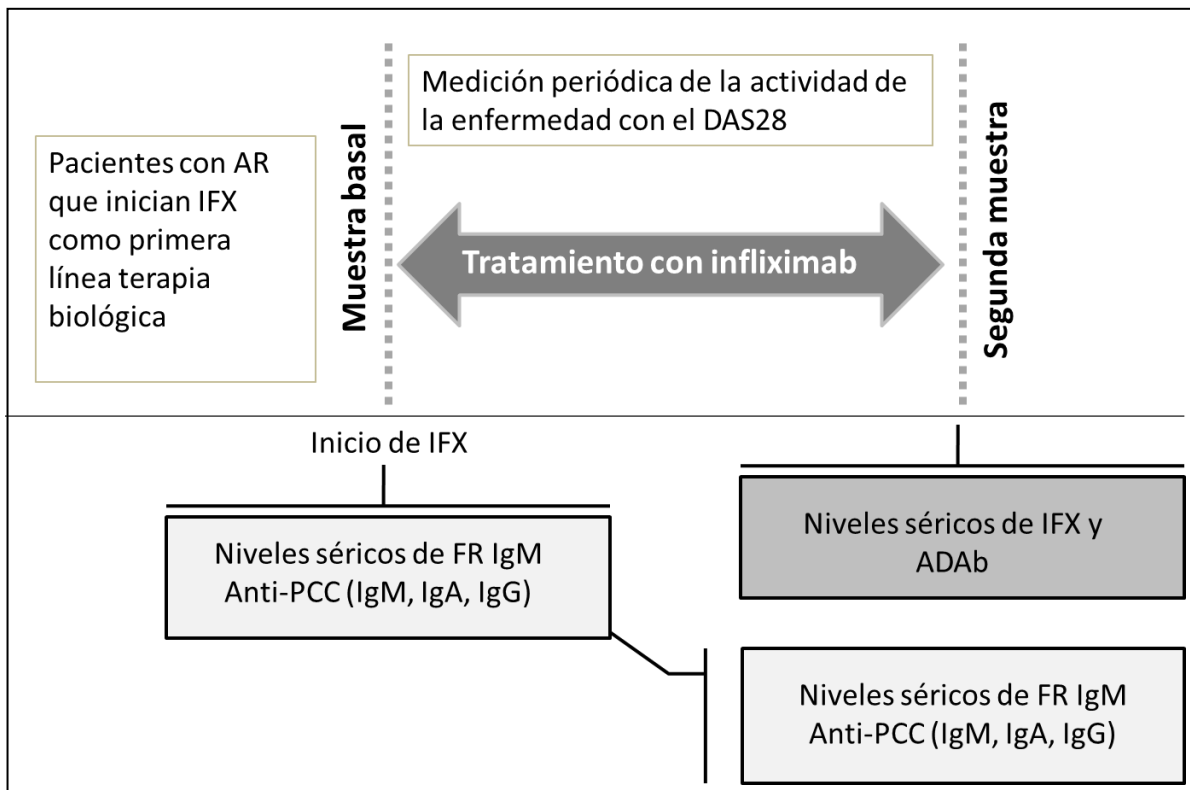


Figura 9. Diagrama del estudio.

### 3.4.1 Actividad de la enfermedad.

Se utilizó el índice de actividad de DAS28. Este era medido en el momento de la muestra basal y cada vez que el paciente acudía al Hospital de Día de Terapias Biológicas (HDTB) para la infusión del tratamiento con IFX. Los pacientes se clasificaron en cuatro grupos de actividad clínica Según se recoge en la siguiente tabla [118]:

	<b>Categoría</b>	<b>Punto de corte</b>
<b>DAS28</b>	Remisión	$\leq 2.6$
	Actividad baja	$>2.6 \leq 3.2$
	Actividad moderada	$>3.2 \leq 5.1$
	Actividad alta	$>5.1$

Tabla 9. Definición de la actividad de la enfermedad según DAS28.

### 3.4.2 Sueros.

Se obtuvieron de la seroteca del Servicio de Reumatología del hospital Gregorio Marañón (1998-2011). El suero de los pacientes se obtenía antes de la infusión de cualquier tratamiento (momento valle) en el HDTB. Las muestras de sangre total se extraían en un tubo de bioquímica de 10 ml y posteriormente eran centrifugadas durante 15 minutos a 1500 rpm para separar el suero en alícuotas de 1,5 ml que fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

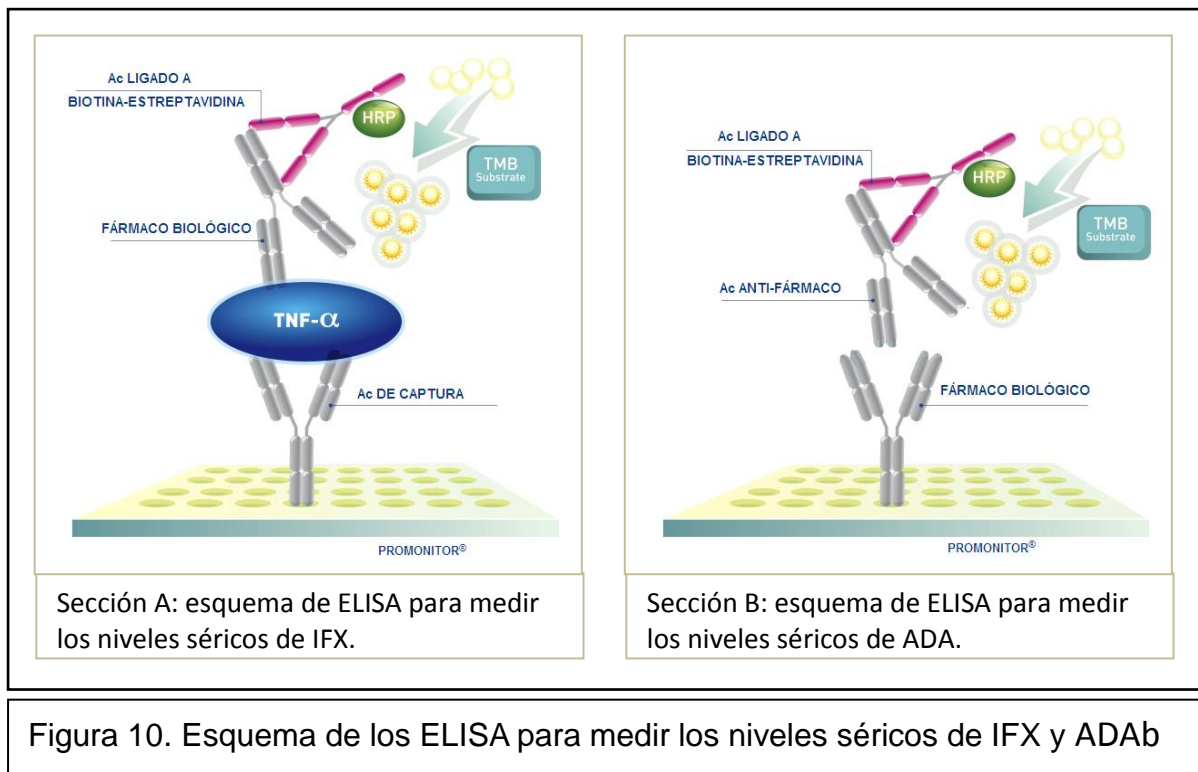
### **3.4.3 Concentraciones séricas de IFX y de ADAb.**

Ambas determinaciones se realizaron mediante técnicas de ELISA (Progenika Biopharma, Spain), siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante.

3.4.3.1 Concentraciones séricas de IFX. Los pocillos de las placas de ELISA de este kit están recubiertos con TNF- $\alpha$  inmovilizado mediante un anticuerpo monoclonal. Durante el primer paso se añaden a cada pocillo por separado las muestras, el calibrador (en este caso el calibrador es el fármaco IFX), el control positivo y el control negativo diluidos. Entonces, se lavan los pocillos para eliminar el fármaco no unido. En la segunda incubación se añade una solución con anticuerpos monoclonales anti-fármaco específicos conjugados con biotina. Después de un segundo lavado, se incuba con el sustrato estreptavidina-peroxidasa, desarrollando una reacción colorimétrica. En el último paso se detiene la reacción con una solución de parada desarrollando un producto final de color. Las unidades de absorbancia de este producto se miden en un espectrofotómetro a 450 nm. Sección B de Figura 10.

3.4.3.2 Concentraciones séricas de ADAb. Los pocillos de la placa de ELISA de este kit están recubiertos con el fármaco IFX. Durante el primer paso se añaden a cada pocillo por separado las muestras, los calibradores, el control positivo y el control negativo diluidos. Entonces, se lavan los pocillos para eliminar los ADAb no

unidos. En la segunda incubación se añade una solución con anticuerpos anti-ADAb monoclonales específicos conjugados con biotina. Posteriormente se realiza el proceso de revelado y lectura según lo descrito en el del ensayo anterior. Sección B de Figura 10.



3.4.3.3 Análisis de los resultados. Para el cálculo de las concentraciones en ambas pruebas se elaboró una curva patrón utilizando una escala semilogarítmica con la concentración de los calibradores y el control positivo en el eje X (escala logarítmica) y la absorbancia en el eje Y (escala lineal). Para el ajuste óptimo de los puntos de la curva se usó un modelo de regresión no lineal, con una curva de

5 parámetros logísticos. La concentración de cada una de las muestras se realizó a partir del ajuste de los valores de absorbancia a los puntos de la curva patrón. El resultado final se obtuvo de la media de los valores obtenidos en la zona de respuesta lineal en la curva. Los resultados finales se expresan en ng/ml para los niveles de IFX y en UA/ml para los ADA b.

El punto de corte para las concentraciones séricas de IFX es  $<0.035 \mu\text{g/ml}$ . Los valores inferiores a este punto indican la ausencia de fármaco sérico libre, los valores desde 0.035 hasta  $1.5 \mu\text{g/ml}$  indican baja concentración del fármaco sérico libre y los valores  $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$  indican una concentración normal del fármaco sérico libre. El punto de corte para los niveles de ADA b es de 2 AU/ml.

#### **3.4.4 Concentraciones séricas de FR y anti-PCC.**

Se determinaron en las muestras de suero basal y en la segunda muestra con técnicas de ELISA.

Se midieron las concentraciones séricas de los isotipos IgG, IgM e IgA para los anti-PCC y del isotipo IgM para el FR. Todas las mediciones de las muestras de un mismo paciente fueron realizadas al mismo tiempo.

3.4.4.1 Concentración sérica de los anti-PCC isotipo IgG. Se usó un kit comercial de ELISA (Axis Sheild Diagnostics, UK). Los pocillos de las placas de ELISA de

este kit están recubiertos con un PCC sintético que contiene residuos de arginina modificada. Durante la primera incubación los anti-PCC en el suero diluido de los pacientes y de los calibradores se unen a la superficie recubierta con el antígeno. Entonces, se lavan los pocillos para eliminar los anti-PCC no unidos. En una segunda incubación una solución de anticuerpos de cabra, policlonales dirigidos contra la IgG humana recombinados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) se unen a cualquier autoanticuerpo unido a la superficie. Después de un segundo lavado, se incuba con el sustrato tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, USA) diluido en buffer de fosfato citrato (pH 5.0) y peróxido de hidrogeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Sigma, USA) desarrollando una reacción colorimétrica azul. En último paso se detiene la reacción con una solución de parada desarrollando un producto final de color amarillo. Las unidades de absorbancia de este producto se miden en un espectrofotómetro a 450 nm.

Para el cálculo de las concentraciones se calcula una curva patrón utilizando una escala semilogarítmica con la concentración de los calibradores (6 calibradores) en el eje X (escala logarítmica) y la absorbancia en el eje Y (escala lineal). El ajuste óptimo de los puntos de la curva se consigue mediante un modelo de regresión no lineal, con una curva de 4 parámetros logísticos. La concentración de cada una de las muestras se realiza a partir del ajuste a los puntos de la curva patrón. Los resultados finales se expresan en UA/ml. El límite inferior de referencia de este ensayo es 5UI/ml y el superior 300 UI/ml.

3.4.4.2 Concentraciones séricas de los anti-PCC isotipos IgA e IgM. Se usaron placas de ELISA con los pocillos recubiertos con antígeno CCP2 (Axis Sheild Diagnostics, UK). El suero de los pacientes y controles se añadió a las placas de ELISA diluido en tampón fosfato salino (PBS: *phosphate buffered saline*) a una concentración de 1:200 y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después del lavado inicial se añadió una solución de anticuerpos dirigidos contra la IgM (1:3200) y contra la IgA (1:6400) humanas diluidos en PBS y conjugados con la enzima HRP (The Binding Site Group, UK). Se incubó por otra hora. Después del segundo lavado se añadió el sustrato TMB (Sigma-Aldrich, USA) diluido en tampón de fosfato citrato (pH 5.0) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Sigma, USA) desarrollando una reacción colorimétrica azul. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 2% originando un producto de color amarillo estable para medir la absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (AU), que se calcularon mediante la expresión de la OD de cada muestra como un porcentaje de la OD de un suero conocido que es positivo a concentraciones altas para cada isotipo.

El punto de corte para cada isotipo se estableció con el suero de cinco controles sanos y correspondía a la media más 3 desviaciones estándar (DE) de estos sueros.

3.4.4.3 Concentración sérica del FR isotipo IgM. La mitad de los pocillos de la placa de ELISA se recubrieron con anticuerpos de conejo dirigidos contra la IgG

humana (1 µg/mL) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) diluidos en tampón bicarbonato (0,06 M; pH 9,6) y la otra mitad se recubrió solo con tampón bicarbonato como control de las uniones inespecíficas, y se incubó durante una noche a temperatura ambiente Después de la incubación las placas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA: bovine serum albumine) al 2% (Sigma-Aldrich, USA) en PBS 10x con 0,05% de tween-20 (PBS-T; Sigma-Aldrich, USA). Los sueros de los pacientes y los controles diluidos 1:200 en PBS-T-BSA se añadieron por duplicado a los pocillos de la placa, una muestra en la mitad recubierta con el anticuerpo anti-IgG y la otra muestra en la mitad recubierta sólo con el tampón bicarbonato. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente y se añadió una solución de anticuerpos de cabra dirigidos contra la IgM humana conjugados con HRP (The Binding Site Group, UK) diluido 1:3200 in PBS-T-BSA. Para la elaboración de la curva y la extrapolación de los resultados se restó la absorbancia correspondiente al blanco de cada muestra. Para la determinación de los niveles de anticuerpos se siguieron los mismos pasos descritos para los anti-PCC IgM e IgA.

### **3.5 Análisis estadístico.**

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.17.0 para Windows.

Se calcularon la media y desviación estándar de la media para las diferentes variables cuantitativas. Las variables categóricas se presentan mediante frecuencias y porcentajes.

La relación entre las variables categóricas se evaluó mediante el test chi-cuadrado. La correlación entre variables cuantitativas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. La comparación de medias para variables cuantitativas se realizó con la prueba de Mann Whitney para muestras independientes y se utilizó la prueba de rango de signos de *Wilcoxon* para examinar los cambios en los niveles de autoanticuerpos.

En todos los análisis se consideró un nivel de significación estadística un valor de la  $p < 0.05$ .

#### **4. Resultados**

#### **4.1 Características demográficas y clínicas basales de los pacientes.**

Se estudiaron 19 pacientes con AR que cumplían los criterios de inclusión. El 84% de los pacientes eran mujeres. La edad media, desviación estándar (DE) y rango al momento del diagnóstico de AR era de 50 años (12) (22-65) y al momento del inicio del tratamiento con IFX era de 58 años (13) (23-79). Doce (63%) pacientes tomaban prednisona y quince (89%) tomaban algún FAME sintético en el momento del inicio del tratamiento con IFX, como se especifica en las tablas 10 y 11. Catorce (74%) de los pacientes fueron positivos para FR IgM. Dieciséis (84%), 18 (95%) y 10 (53%) pacientes fueron positivos para anti-PCC IgM, IgG e IgA, respectivamente. Todos los pacientes tenían actividad de la AR según el DAS28.

<b>Características basales</b>	<b>Todos los pacientes (19)</b>
<b>Sexo (% mujeres)</b>	<b>16 (84)</b>
<b>Edad al diagnóstico, media(DE)(rango)</b>	<b>50 (12)(22-65)</b>
<b>Edad al inicio de IFX, media (DE)(rango)</b>	<b>58 (13)(23-79)</b>
<b>FAME al inicio de IFX (%)</b>	<b>15 (79)</b>
<b>Metotrexato. Pacientes (%)</b>	<b>10 (53)</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	11 (2.9)(7.5-25)
<b>Leflunomida. Pacientes (%)</b>	<b>3 (16)</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	20 (0)
<b>Azatioprina. Pacientes (%)</b>	<b>2 (10)</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	125 (35)(100-150)
<b>Prednisona. Pacientes (%)</b>	<b>12(63)</b>
Dosis media (DE)(rango)	9.6 (6.6)(5-25)

Tabla 10. Características demográficas y clínicas basales.

Características basales	Todos los pacientes (19)
<b>Pacientes positivos para FR IgM (%)</b>	<b>14 (74)</b>
Media (DE)(rango)	115 (138)(12-401)
<b>Pacientes positivos para ACPA IgM (%)</b>	<b>16 (84)</b>
Media (DE)(rango)	65 (21)(28-95)
<b>Pacientes positivos para ACPA IgG (%)</b>	<b>18 (95)</b>
Media (DE)(rango)	127 (121)(5.4-349)
<b>Pacientes positivos para ACPA IgA (%)</b>	<b>10 (53)</b>
Media (DE)(rango)	80 (22)(58-111)
<b>Pacientes con DAS28&gt;3,2</b>	<b>19 (100)</b>
<b>DAS28 media (DE)(rango)</b>	<b>5.5 (0.94)(3.4-7.1)</b>

Tabla 11. Características demográficas y clínicas basales.

#### 4.2 Concentraciones séricas de IFX y ADA b

Ocho (42%) de los 19 pacientes tenían concentraciones séricas detectables de IFX (IFX-pos) y 11 (58%) pacientes no las tenían (IFX-neg). Nueve (47%) pacientes tenían ADA b, 8 de estos pacientes eran IFX-neg y 1 paciente era IFX-pos (p 0,009). Figura 11.

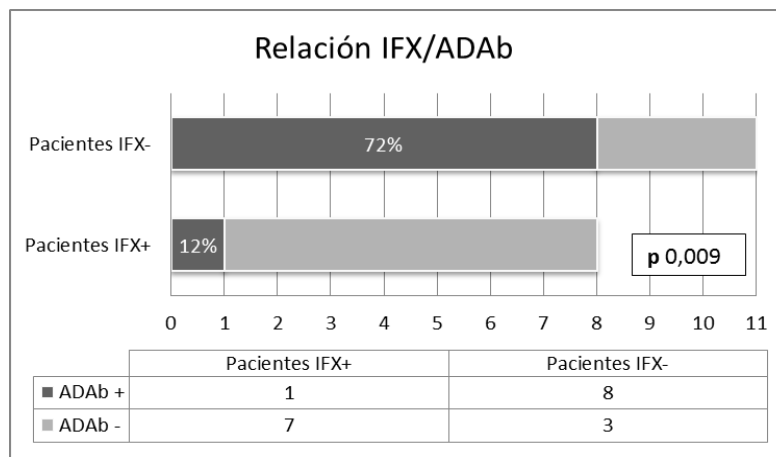


Figura 11. Relación entre la presencia de IFX y ADA b

La tabla 12 muestra la concentración la media, la desviación estándar y el rango de las concentraciones de IFX y ADA b en los pacientes IFX-pos e IFX-neg.

Con. séricas. media (DE)(rango)	IFX-pos (8 pacientes)	IFX-neg (11 pacientes)	p
<b>IFX</b>	3 (4,5)(0,28-13)	0,03 (0,008)(0,01-0,04)	<0,05
<b>ADAb</b>	2,4 (0,99)(2-4,8)	130(190) (2-640)	<0,05

Tabla 12. Concentraciones séricas de IFX y ADA b en IFX-pos e IFX-neg.

#### **4.3 Características clínicas basales de los pacientes IFX-pos/IFX-neg.**

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes IFX-pos y los pacientes IFX-neg, al momento de iniciar el tratamiento con IFX.

Característica al inicio de IFX	IFX-pos (8 pacientes)	IFX-neg (11 pacientes)	p
<b>Sexo (% mujeres)</b>	<b>7 (88)</b>	<b>9 (82)</b>	<b>0,73</b>
<b>Edad al diagnóstico, media(DE)(rango)</b>	<b>53 (9,1)(39-65)</b>	<b>47 (14)(22-65)</b>	<b>0,43</b>
<b>Edad al inicio de IFX, media(DE)(rango)</b>	<b>62 (12)(44-79)</b>	<b>55 (14)(23-76)</b>	<b>0,28</b>
<b>Meses desde el dco hasta el inicio de IFX media(DE)(rango)</b>	<b>110 (69)(14-200)</b>	<b>93 (87)(13-270)</b>	<b>0,59</b>
<b>Pacientes que tomaban FAME (%)</b>	<b>7 (88)</b>	<b>8 (72)</b>	<b>0,43</b>
<b>Metotrexato. Pacientes (%)</b>	<b>3 (37)</b>	<b>7 (63)</b>	<b>0,25</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	9,2 (1,4)(7,5-10)	12 (3,1)(7,5-15)	0,27
<b>Leflunomida. Pacientes (%)</b>	<b>2 (25)</b>	<b>1 (10)</b>	<b>0,34</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	20	20	1
<b>Azatioprina. Pacientes (%)</b>	<b>2 (25)</b>	<b>0</b>	<b>0,07</b>
Dosis media en mg (DE)(rango)	125 (35)(100-150)	0	–
<b>Pacientes que tomaban prednisona (%)</b>	<b>6 (75)</b>	<b>6 (54)</b>	<b>0,36</b>
Dosis media (DE)(rango)	11 (7,4)(5-25)	8,3 (6,1)(5-20)	0,38
<b>DAS28 media (DE)(rango)</b>	<b>5,7 (0,99)(4,4-7,1)</b>	<b>5,3 (0,91)(3,4-6,1)</b>	<b>0,59</b>

Tabla 13. Características basales de los pacientes IFX-pos e IFX-neg.

#### **4.4 Características clínicas de los pacientes IFX-pos/IFX-neg al momento de la segunda muestra.**

En la tabla 14 se muestran las diferencias clínicas entre los pacientes IFX-pos y los pacientes IFX-neg al momento de la segunda muestra.

Características al momento de medir los niveles de IFX	IFX-pos (8 pacientes)	IFX-neg (11 pacientes)	p
Edad, media(DE)(rango)	63 (12)(46-81)	56 (14)(25-78)	0,24
Meses desde el dco hasta el inicio de IFX media(DS)(rango)	110 (69)(14-200)	93 (87)(13-270)	0,59
Meses de tratamiento con IFX media(DE)(rango)	20 (6,8)(8-26)	19 (7,2)(6-29)	0,71
Dosis media de IFX (DE)(rango)	310 (64)(200-400)	260 (50)(200-300)	0,11
Pacientes que tomaban FAME (%)	8 (100)	5 (45)	0,01
Metotrexato. Pacientes (%) Dosis media en mg (DE)(rango)	3 (37) 6,7 (1,4)(5-7,5)	3 (27) 9,2(1,4)(7,5-10)	0,63 0,16
Leflunomida. Pacientes (%) Dosis media en mg (DE)(rango)	4 (50) 15 (5,8)(10-20)	2 (18) 20 (0)	0,14 0,85
Azatioprina. Pacientes (%) Dosis media en mg (DE)(rango)	1 (12) 100 (0)	0 0	0,22 -
Pacientes que tomaban prednisona (%) Dosis media (DE)(rango)	4 (50) 6,9 (3,8)(2,5-10)	5 (45) 11 (8,2)(5-25)	0,84 0,54
DAS28 media (DE)(rango)	4.1 (1,6)(2,3-6,6)	5 (1,4)(1.2-6-4)	0,23
Pacientes en remisión/baja actividad según DAS28 (%)	4 (50)	1 (9)	0,04
Concentración sérica de IFX, media (DE)(rango)	3 (4,5)(0,28-13)	0,03 (0,008)(0,01-0,04)	<0,05
Concentración sérica de ADA b, media (DE)(rango)	2,4 (0,99)(2-4,8)	130(190) (2-640)	<0,05
Pacientes ADA b positivo (%)	1	8	<0,05

Tabla 14. Características clínicas al momento de la segunda muestra de los pacientes IFX-pos e IFX-neg.

No hubo diferencias significativas en la edad, tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio del IFX, tiempo de tratamiento con IFX, dosis media de IFX y la media de DAS28.

Todos los pacientes IFX-pos estaban siendo tratados con un FAME sintético concomitante al tratamiento con IFX, en comparación con 5 (45%) de los pacientes IFX-neg (p 0,01).

En el momento de la segunda muestra, 5 de los 19 pacientes estaban en remisión o baja actividad de la enfermedad según el DAS28 (DAS28 <3,2). Cuatro (80%) de estos pacientes eran IFX-pos y 1 (20%) era IFX-neg (p 0,04). Éste último paciente estaba siendo tratado con 7,5 mg de prednisona.

#### **4.5 Relación entre los niveles de autoanticuerpos y la presencia de IFX**

##### **4.5.1. Concentraciones basales de los autoanticuerpos: FR isotipo IgM y anti-PCC isotipos IgA, IgG e IgM**

No encontramos diferencias estadísticamente significativas, entre los pacientes IFX-pos y los pacientes IFX-neg, en las concentraciones basales de FR isotipo IgM y anti-PCC isotipos IgA, IgG e IgM. Tabla 15.

Concentraciones séricas de autoanticuerpos	IFX-positivo (8 pacientes)	IFX-negativo (11 pacientes)	p
<b>Pacientes positivos para FR IgM (%)</b> Media (DE)(rango)	<b>7 (88)</b> 90 (149)(12-400)	<b>7 (63)</b> 140 (140)(12-400)	<b>0,6</b> 0,45
<b>Pacientes positivos para ACPA IgM (%)</b> Media (DE)(rango)	<b>7 (88)</b> 64 (24)(28-95)	<b>9 (82)</b> 66 (19)(45-90)	<b>0,73</b> 0,91
<b>Pacientes positivos para ACPA IgG (%)</b> Media (DE)(rango)	<b>8 (100)</b> 130 (110)(13-280)	<b>10 (91)</b> 130 (130)(5,4-350)	<b>0,38</b> 0,96
<b>Pacientes positivos para ACPA IgA (%)</b> Media (DE)(rango)	<b>6 (75)</b> 80 (24)(58-110)	<b>4 (36)</b> 79 (23)(58-110)	<b>0,09</b> 0,76

Tabla 15. Concentraciones basales de FR y anti-PCC en IFX-pos e IFX-neg.

**4.6 Comparación del cambio en las concentraciones de los anti-PCC y el FR, antes y después del tratamiento con IFX, entre los pacientes IFX-positivo y los pacientes IFX-negativo.**

**4.6.1 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgG.**

Todos los pacientes IFX-pos y 10 de los pacientes IFX-neg fueron seropositivos para los anti-PCC IgG en la muestra basal (p 0,38).

Los pacientes IFX-pos presentaron un descenso estadísticamente significativo en las concentraciones séricas de los anti-PCC IgG (p 0,07).

El cambio en la concentración de los anti-PCC IgG no fue significativo en los pacientes IFX-neg ( $p = 1.0$ ). En la figura 12 se muestra los cambios en la concentración de estos autoanticuerpos en los pacientes de ambos grupos.

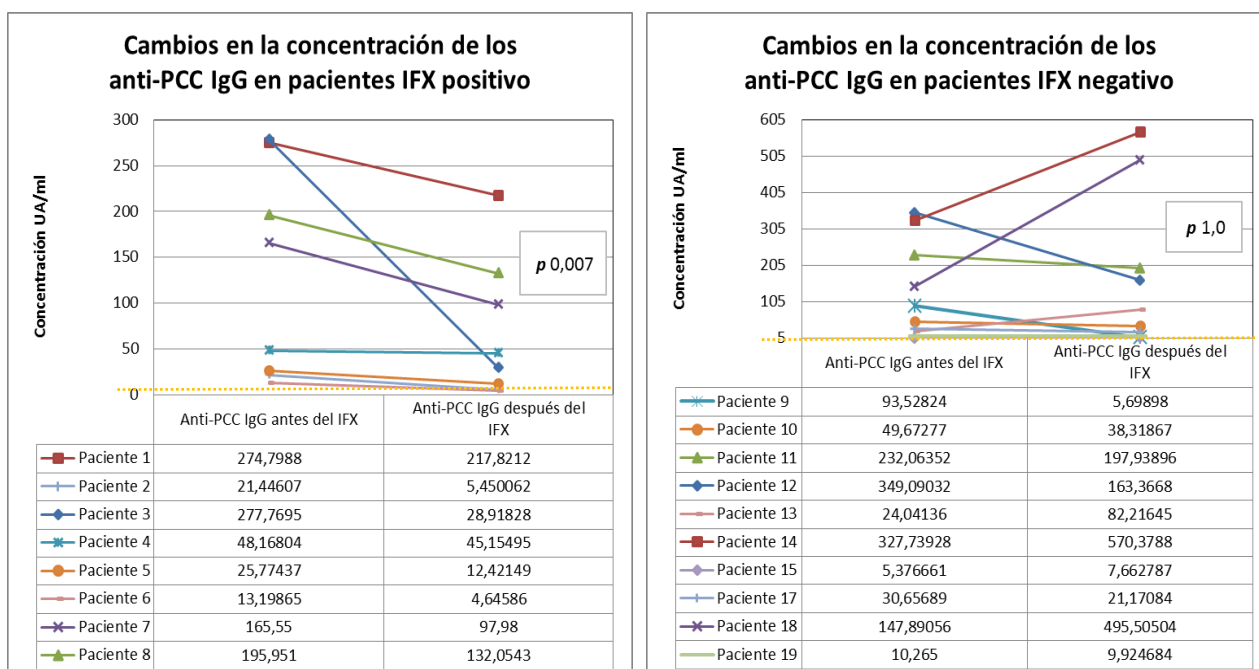


Figura 12. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgG

#### 4.6.2 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgM

En la muestra basal 7 (88%) de los 8 pacientes IFX-pos y 9 (82%) de los 11 pacientes IFX-neg fueron positivos para los anti-PCC IgM ( $p = 0,73$ ). Cuatro pacientes IFX-pos y 2 pacientes IFX-neg se convirtieron en seronegativos tras el tratamiento. Ninguno de los pacientes se convirtió en seropositivo.

Los pacientes IFX-pos tuvieron un descenso significativo en la concentración de los anti-PCC IgM después del tratamiento con IFX ( $p$  0,01). En los pacientes IFX-neg el cambio en la concentración de estos autoanticuerpos no fue significativo ( $p$  0,16). Figura 13.

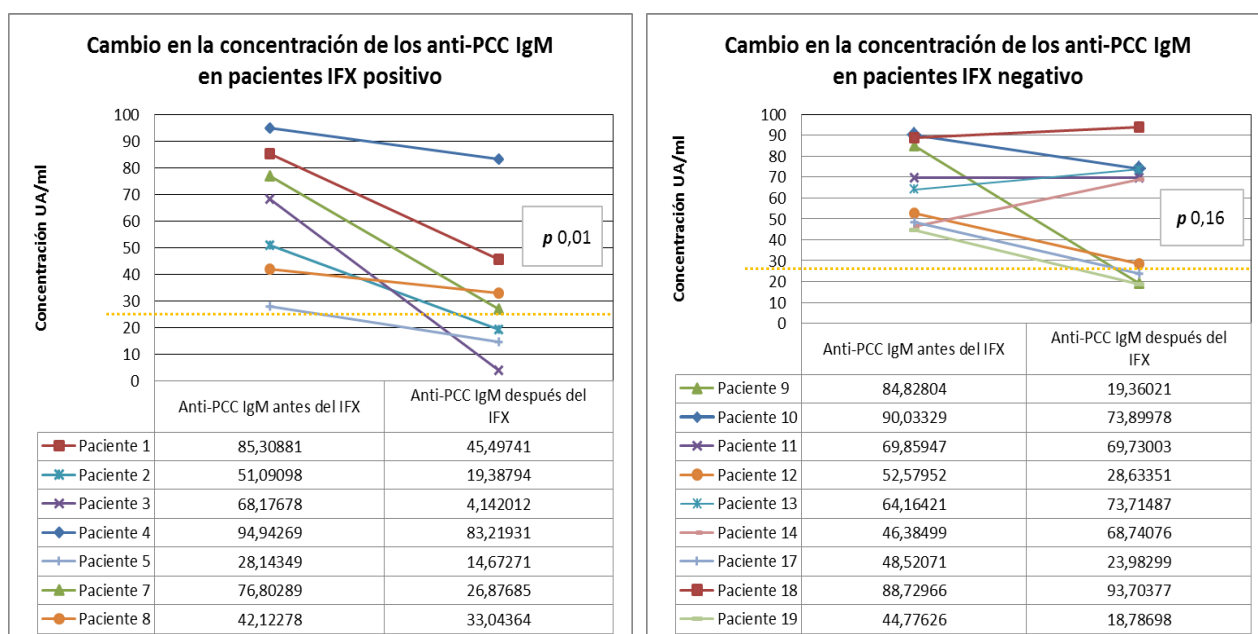


Figura 13. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgM

#### 4.6.3 Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgA

En la muestra basal 6 (75%) de los 8 pacientes IFX-pos y 4 (36%) de los 11 pacientes IFX-neg fueron positivos para los anti-PCC IgA ( $p$  0,09). Dos pacientes IFX-pos y 1 pacientes IFX-neg se convirtieron en seronegativos tras el tratamiento. Dos pacientes IFX-neg se convirtieron en seropositivos.

Los pacientes IFX-pos tuvieron un descenso significativo en la concentración de los anti-PCC IgA tras el tratamiento con IFX ( $p$  0,03). En los pacientes IFX-neg el cambio en la concentración de estos autoanticuerpos no fue significativo ( $p$  0,44).

Figura 14.

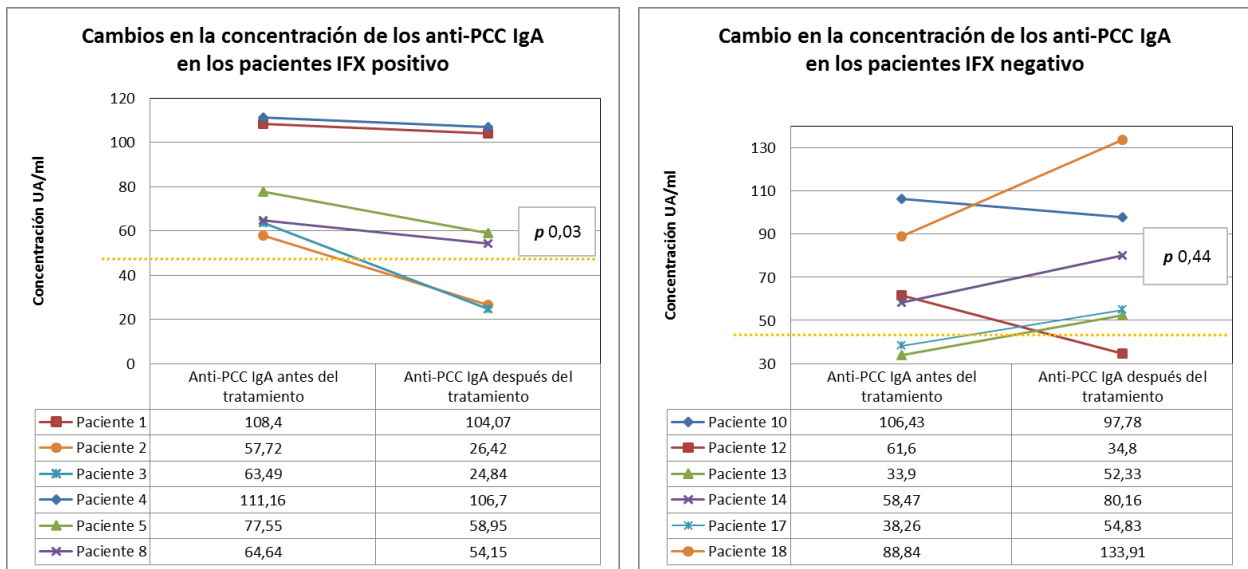


Figura 14. Cambio en la concentración de los anti-PCC isotipo IgA

#### 4.6.4 Cambio en la concentración del FR isotipo IgM

En la muestra basal 7 (88%) de los 8 pacientes IFX-pos y 7(63%) de los 11 pacientes IFX-neg fueron positivos para el FR- IgM ( $p$  0,6). Tres pacientes IFX-pos se convirtieron en seronegativos y un paciente IFX-neg se convirtió en seropositivo, tras el tratamiento.

En la figura 15 se muestra el cambio en la concentración del FR IgM, antes y después del tratamiento, en los pacientes seropositivos de cada grupo. En el grupo de pacientes IFX-pos hubo en descenso significativo en la concentración sérica de FR IgM tras el tratamiento con IFX ( $p$  0,01), mientras que en el grupo de pacientes IFX-neg no se evidenció ningún cambio significativo en la concentración de este autoanticuerpo ( $p$  0,31)

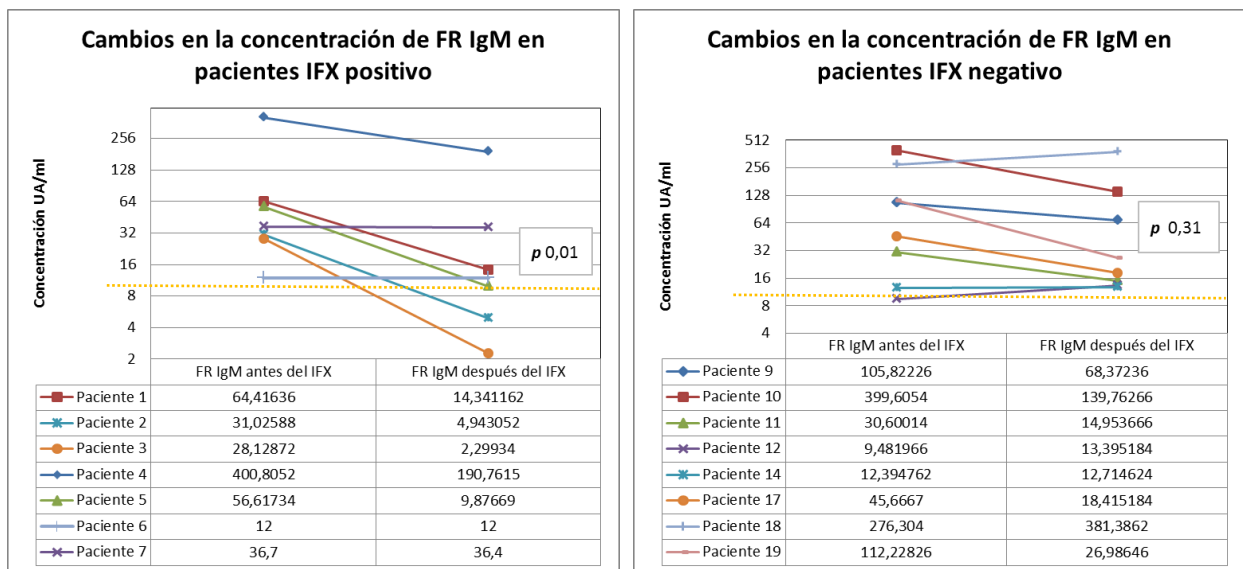


Figura 15. Cambio en la concentración del FR isotipo IgM

## **5. Discusión**

Han pasado veinte años desde que se aprobó el primer fármaco biológico para el tratamiento de la AR, un bloqueador del TNF- $\alpha$  llamado infliximab. Desde entonces se han aprobado otros 4 fármacos con este mecanismo de acción convirtiéndolos en un pilar fundamental entre las opciones terapéuticas de la AR. La respuesta clínica a los anti-TNF- $\alpha$  es muy variable en muchos casos se consigue la remisión de la enfermedad, sin embargo, una cantidad sustancial de pacientes no responden, persisten con actividad de la enfermedad o presentan recaídas a pesar de este tratamiento [170, 171].

Los marcadores clínicos, radiológicos, serológicos y genéticos disponibles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tienen un valor limitado a la hora de predecir de manera precisa la respuesta al tratamiento y las recaídas. En ausencia de marcadores, la decisión de cambiar un anti-TNF- $\alpha$  por otro fármaco biológico se basa en la respuesta clínica y perfil de seguridad de los fármacos.

El reto actual es el desarrollo de pautas de tratamiento personalizadas para los pacientes con AR. La investigación en reumatología se ha dirigido al descubrimiento, desarrollo y validación de marcadores que nos permitan escoger la terapia biológica adecuada para cada paciente y predecir su respuesta de manera deliberada, optimizando así el uso de las terapias biológicas. En esta línea, las mediciones de las concentraciones séricas del fármaco y de los anticuerpos anti-fármaco (ADAb: *antidrug antibodies*) se han considerado en los últimos años como posibles marcadores serológicos para predecir la respuesta al tratamiento de la AR [125, 155, 156].

La correlación entre la formación de ADA<sub>b</sub>, las concentraciones séricas bajas de IFX y la actividad inflamatoria de la enfermedad ha sido demostrada en diferentes estudios de pacientes con AR y otras patologías. Los ADA<sub>b</sub> contra IFX se presentan con una frecuencia que oscila desde el 8% hasta el 52% en los diferentes estudios. En la mayoría de estos estudios se ha demostrado una relación inversa entre la presencia de ADA<sub>b</sub> y las concentraciones de IFX sérico. La presencia de ADA<sub>b</sub> se ha asociado con la ineficacia al tratamiento, la pérdida de la respuesta clínica y el aumento en la tasa de discontinuación del fármaco [127-154].

En la detección de los ADA<sub>b</sub>, sin embargo, influyen muchos factores principalmente el tipo de ensayo usado para detectarlos. En la mayoría de los estudios publicados se han usado las técnicas de ELISA o RIA. Ambas técnicas detectan los ADA<sub>b</sub> sólo si la concentración de estos es superior a la concentración sérica del fármaco, fenómeno llamado interferencia por el fármaco. La presencia de FR también puede interferir en la detección de los ADA<sub>b</sub>. El FR es un anticuerpo dirigido contra la fracción Fc de las IgG y puede enmascarar los ADA<sub>b</sub> capturados en estos ensayos. Otros factores que pueden influir como la dosis de fármaco usada y el momento en que se miden estos anticuerpos no han sido estandarizados en los diferentes estudios y aunque se han creado nuevos ensayos para superar estas limitaciones la validación de los procedimientos de laboratorio de rutina para detectar ADA<sub>b</sub> sigue siendo un enorme reto [157, 158, 160].

La pérdida de eficacia de un fármaco secundaria a la presencia de ADA b, por otra parte, puede ser asumible si la concentración de estos ADA b es superior a la del fármaco libre para unirse a su diana. Aunque la mayoría de los estudios se centran en la posible asociación de los ADA b con la pérdida de respuesta a los anti-TNF, en la práctica clínica parece más útil la medición de los niveles libres del fármaco a la hora de predecir la respuesta a estos fármacos.

Desde los primeros ensayos clínicos realizados con IFX en pacientes con AR, como el estudio ATTRACT (Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with concomitant Therapy) se demostró que la respuesta clínica se relacionaba con la concentración sérica de IFX. En este estudio se observó que los pacientes con concentraciones séricas de IFX más altas a la semana 52 de tratamiento tenían una tasa de respuesta al tratamiento superior, una mayor reducción en los niveles de PCR y menor progresión radiológica según el índice de Sharp. Resultados similares se han encontrado en pacientes con AR tratados con adalimumab y etanercept [172].

En este trabajo se incluyeron 19 pacientes con AR que fueron tratados con IFX como primera línea de terapia biológica. Las características clínicas de estos pacientes son similares a las descritas en el estudio emAR de la Sociedad Española de Reumatología, en el que se analizaron los datos clínicos de 1.272 pacientes con AR atendidos en servicios de Reumatología de hospitales

españoles, seleccionados por muestreo estratificado en las diferentes comunidades autónomas [173].

Ocho de los 19 pacientes fueron IFX-positivo y 11 pacientes fueron IFX-negativo. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas y clínicas basales de los pacientes IFX-pos e IFX-neg. Todos los pacientes estaban activos según el DAS28 en el momento que se inició el tratamiento con IFX. Al momento de medir los niveles séricos de IFX y ADA<sub>b</sub>, no encontramos diferencias en la media de tiempo de tratamiento y dosis media de IFX.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de IFX sérico y la respuesta al tratamiento. La mitad de los pacientes IFX-pos se encontraban en remisión o baja actividad de la enfermedad y solo uno (9%) de los pacientes IFX-neg alcanzó esta condición, en este paciente la respuesta clínica podría estar asociada a la toma de corticoides. Luego los pacientes IFX-pos tienen mayor probabilidad de alcanzar la remisión.

Nueve (47%) de nuestros pacientes tenían ADA<sub>b</sub>, la frecuencia descrita de ADA<sub>b</sub> contra IFX en otros estudios es muy variable y oscila entre el 8% y el 52%. La presencia de ADA<sub>b</sub> se asoció a la ausencia de concentraciones séricas detectables de IFX, 8 (78%) de los pacientes IFX-neg tenían ADA<sub>b</sub> en comparación a sólo uno (12%) de los pacientes IFX-pos (p 0,009). En este último paciente las concentraciones séricas de IFX eran bajas.

Muchos factores relacionados con el fármaco o con el mismo paciente pueden influenciar la inmunogenicidad de las terapias biológicas. En pacientes con AR en tratamiento con IFX y ADA, el uso concomitante de MTX ha demostrado que reduce la inmunogenicidad de una manera dosis dependiente, disminuyendo tanto la tasa de desarrollo de ADA<sub>b</sub> como retrasando su aparición [155].

El mecanismo exacto por el que sucede este fenómeno es desconocido. En nuestro estudio no encontramos ninguna asociación entre el tratamiento con FAME concomitante con la presencia de ADA<sub>b</sub>, pero si con la presencia de IFX. Todos los pacientes que fueron IFX-*pos* estaban tomando algún FAME sintético en el momento que se midió la concentración del fármaco, comparado con 5 (45%) de los pacientes que fueron IFX-*neg* ( $p < 0,01$ ).

Como ha sido demostrado en otros estudios la relación entre niveles de IFX con la respuesta clínica y con la presencia de ADA<sub>b</sub> es inexacta [127-154]. Una cuarta parte de nuestros pacientes IFX-*neg* no presentaban ADA<sub>b</sub>. Esto sugiere que otros factores diferentes a la inmunogenicidad pueden influir en la cinética del fármaco. La mitad de nuestros pacientes IFX-*pos*, por otra parte, no cumplieron los objetivos de respuesta clínica al tratamiento, reafirmando que la AR es una enfermedad compleja y variable en las vías relacionadas con su fisiopatología.

El FR y los anti-PCC son los principales marcadores biológicos en la AR, forman parte de los criterios de clasificación de la enfermedad y se acepta que participan en la iniciación y perpetuación de la AR [101]. El FR y los anti-PCC son

considerados marcadores de mal pronóstico asociados con la progresión radiológica y la severidad de los síntomas [52- 57, 71].

La relación entre los cambios en la concentración de estos autoanticuerpos y la respuesta a los anti- TNF- $\alpha$  es variable en los diferentes estudios y no se aceptan como factores de predicción y de seguimiento de la respuesta a los anti- TNF- $\alpha$ , sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha evaluado el efecto que tiene la concentración libre del medicamento en relación a las concentraciones de FR y anti-PCC y la actividad de la enfermedad [161-168].

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el cambio en los niveles de FR y anti-PCC, antes y después del tratamiento, y su relación con los niveles séricos del fármaco en un grupo de pacientes con AR tratados con IFX.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones basales del FR isotipo IgM y los anti-PCC IgA, IgG e IgM entre los pacientes que fueron IFX-pos y los pacientes IFX-neg. Las concentraciones basales de estos autoanticuerpos no predicen la respuesta al tratamiento con IFX en nuestros pacientes.

El cambio en las concentraciones séricas de estos autoanticuerpos, antes y después del tratamiento fue analizado con el test de Wilcoxon para datos apareados de manera independiente en los pacientes IFX-pos y en los pacientes IFX-neg.

Los pacientes que tenían concentraciones séricas detectables de IFX presentaron un descenso significativo en las concentraciones séricas de los autoanticuerpos anti-PCC de los isotipos IgA, IgM e IgG y del FR isotipo IgM. Los pacientes IFX-neg no presentaron cambios significativos en las concentraciones séricas de estos autoanticuerpos antes y después del tratamiento.

La explicación para dichos cambios puede encontrarse en la célula B.

En la patogenia de la AR existe una compleja interacción entre las diferentes células y moléculas del sistema inmune innato y adaptativo [5, 81]. El papel del TNF- $\alpha$  y de las células B en la AR ha sido demostrado indirectamente por la eficacia clínica de los tratamientos dirigidos contra estas dianas [95, 104].

La producción de citoquinas por diferentes células sinoviales es fundamental en la patogénesis de la AR. El TNF- $\alpha$  se encuentra en la cabeza de esta compleja red de citoquinas, tiene un papel principal promoviendo la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias, de moléculas endoteliales de adhesión celular, la migración de células inflamatorias, la angiogénesis y la supresión de células T reguladoras [5, 174].

El TNF- $\alpha$ , además, tiene un efecto directo sobre las células B a través de los receptores TNFR1 y TNFR2 presentes en la membrana de estas células y participa en el desarrollo de las células dendríticas foliculares esenciales para la formación de los centros germinales en los órganos linfoides secundarios [175-178].

Las células B, a su vez, son productoras de TNF- $\alpha$ , por lo que es razonable postular que la eficacia de los fármacos anti- TNF- $\alpha$  podría estar mediada por un posible efecto anti-células B y la depleción de células B podría imitar alguno de los efectos de los anti- TNF- $\alpha$ , mediante la eliminación de una fuente de TNF- $\alpha$  [179, 180].

Anolik et al. estudiaron el efecto del tratamiento con anti- TNF- $\alpha$  sobre los órganos linfoides secundarios y en las subpoblaciones de células B en sangre periférica en pacientes con AR [181].

Realizaron análisis de inmunohistoquímica en biopsias de amígdalas tomadas de pacientes con AR tratados con etanercept y de individuos sanos, encontrando que tanto la proporción de células dendríticas foliculares, como el número y el tamaño de los centros germinales en los folículos secundarios era significativamente inferior en los pacientes tratados con anti- TNF- $\alpha$ .

Además, estudiaron las subpoblaciones de células B en sangre periférica de individuos sanos, pacientes con AR tratados con MTX y pacientes tratados con etanercept. Los pacientes tratados con anti- TNF- $\alpha$  presentaban una proporción significativamente menor de células B de memoria que los pacientes tratados con MTX y los individuos sanos.

Las células B de memoria son antígeno específicas. Expresan en su superficie anticuerpos de diferentes isotipos con alta afinidad por antígenos específicos, su precursor las células B foliculares son activadas por medio de antígenos con la

ayuda de las células T en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios fenómeno que da lugar a la hipermutación somática y el cambio de isotipo. Las células B de memoria al reencontrarse con su antígeno específico se diferencian en plasmablastos estos migran a los tejidos inflamados o a la médula ósea donde se convierten en células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos como el FR y los anti-PCC [92].

En nuestros pacientes el descenso en las concentraciones de FR y anti-PCC estuvo asociado a la presencia de IFX sérico libre, estos hallazgos concuerdan con los resultados encontrados por Anolik et al. En la sinovial de los pacientes con AR aparecen estructuras como centros germinales, la alteración de estos con la terapia anti- TNF- $\alpha$  podría interrumpir las interacciones celulares que se producen en estos centros germinales entre células T y células B que son esenciales para la producción de anticuerpos. Además, el tratamiento con anti- TNF- $\alpha$  alteró las subpoblaciones de células B, disminuyendo la proporción de células B de memoria en sangre periférica que son las precursoras de los plasmablastos, que finalmente son las células secretoras de anticuerpos específicos como el Fr y los anti-PCC.

En conclusión, en este estudio observamos que una proporción mayor de pacientes con concentraciones séricas adecuadas del fármaco alcanzaron la remisión de la enfermedad y que existe una asociación inversa entre la presencia de ADAb y la concentración sérica libre del fármaco, como se ha observado en otros estudios.

El resultado más relevante es que observamos que la disminución en las concentraciones de anti-PCC y FR en pacientes con AR tratados con IFX está asociada a la presencia de concentraciones séricas adecuadas del fármaco. Esto apoya el papel de los anti-TNF- $\alpha$  en la modificación de la enfermedad no solo actuando como una terapia anticitoquina sino demostrando indirectamente su efecto sobre la célula B y la formación de autoanticuerpos.

La limitación más importante de nuestro estudio es el tamaño de la muestra, lo que hace necesario estudios adicionales que confirmen estos hallazgos, además de su correlación con desenlaces clínicos. Estos estudios tienen como objetivo determinar patrones moleculares en relación al perfil de cada paciente, en el intento de individualizar y caracterizar la enfermedad y de esta forma disminuir complicaciones, daño estructural y limitación funcional de los pacientes, a través de nuevas herramientas que le permitan al clínico una terapia dirigida, con una monitorización más precisa de la AR.

## **6. Conclusiones**

6.1. Observamos una asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas adecuadas de Infliximab y la disminución de las concentraciones séricas de los autoanticuerpos FR y anti-PCC.

6.2 Una proporción mayor de pacientes con infliximab positivo se encontraba en remisión de la enfermedad en comparación con los pacientes infliximab negativo.

6.3 Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos anti-fármaco y la ausencia de concentraciones séricas adecuadas del fármaco.

## Referencias

1. Harris, E.D., S. Ruddy, and W.N. Kelley, *Kelley's textbook of rheumatology*. 7th ed. Vol. 2. 2005, Philadelphia, Pa.: Elsevier/Saunders : Elsevier.
2. Gabriel, S.E., *The epidemiology of rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001. **27**(2): p. 269-81.
3. Carmona, L., et al., *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain*. *Rheumatology (Oxford)*, 2002. **41**(1): p. 88-95.
4. Bevaart, L., M.J. Vervoordeldonk, and P.P. Tak, *Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis?* *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(8): p. 2192-205.
5. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(23): p. 2205-19.
6. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 30-7.
7. van der Woude, D., et al., *Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(4): p. 916-23.
8. Deighton, C.M., et al., *The contribution of HLA to rheumatoid arthritis*. *Clin Genet*, 1989. **36**(3): p. 178-82.
9. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(10): p. 702-9.
10. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(11): p. 782-6.
11. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
12. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(12): p. 889-99.
13. Hill, J.A., et al., *Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule*. *J Immunol*, 2003. **171**(2): p. 538-41.
14. Karlson, E.W., et al., *Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(6): p. 1077-85.
15. Gregersen, P.K. and F. Batliwalla, *PTPN22 and rheumatoid arthritis: gratifying replication*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(7): p. 1952-5.
16. Begovich, A.B., et al., *A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(2): p. 330-7.
17. Vang, T., et al., *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. *Nat Genet*, 2005. **37**(12): p. 1317-9.
18. Vessey, M.P., L. Villard-Mackintosh, and D. Yeates, *Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis*. *Contraception*, 1987. **35**(5): p. 457-64.
19. Heliovaara, M., et al., *Smoking and risk of rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1993. **20**(11): p. 1830-5.

20. Stolt, P., et al., *Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 835-41.
21. Silman, A.J., J. Newman, and A.J. MacGregor, *Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 732-5.
22. Pedersen, M., et al., *Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. R133.
23. Wolfe, F., *The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 630-7.
24. Manfredsdottir, V.F., et al., *The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(6): p. 734-40.
25. Westhoff, G., R. Rau, and A. Zink, *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), 2008. **47**(6): p. 849-54.
26. Soderlin, M.K., et al., *Smoking at onset of rheumatoid arthritis (RA) and its effect on disease activity and functional status: experiences from BARFOT, a long-term observational study on early RA*. Scand J Rheumatol, 2011. **40**(4): p. 249-55.
27. Linn-Rasker, S.P., et al., *Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(3): p. 366-71.
28. Oliveira, R.D., et al., *Share epitope, citrullinated cyclic peptide antibodies and smoking in Brazilian rheumatoid arthritis patients*. Clin Rev Allergy Immunol, 2008. **34**(1): p. 32-5.
29. Padyukov, L., et al., *A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(10): p. 3085-92.
30. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 38-46.
31. Kallberg, H., et al., *Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(5): p. 867-75.
32. Stastny, P., *Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 1978. **298**(16): p. 869-71.
33. Rantapaa-Dahlqvist, S., et al., *Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2741-9.
34. Deane, K.D., J.M. Norris, and V.M. Holers, *Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation*. Rheum Dis Clin North Am, 2010. **36**(2): p. 213-41.
35. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 380-6.
36. Nielen, M.M., et al., *Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2423-7.

37. Hueber, W., et al., *Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(6): p. 712-9.
38. Rantapaa-Dahlqvist, S., et al., *Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(1): p. 121-3.
39. Waaler, E., [*Rheumatoid factor in the 1930s and today*]. Nord Med, 1970. **83**(44): p. 1385-9.
40. Kunkel, H.G., *Significance of the rheumatoid factor*. Arthritis Rheum, 1958. **1**(4): p. 381-3.
41. Kunkel, H.G., E.C. Franklin, and H.J. Muller-Eberhard, *Studies on the isolation and characterization of the "rheumatoid factor"*. J Clin Invest, 1959. **38**(2): p. 424-34.
42. Kunkel, H.G., H.J. Simon, and H. Fudenberg, *Observations concerning positive serologic reactions for rheumatoid factor in certain patients with sarcoidosis and other hyperglobulinemic states*. Arthritis Rheum, 1958. **1**(4): p. 289-96.
43. Procaccia, S., et al., *IgM, IgG and IgA rheumatoid factors and circulating immune complexes in patients with AIDS and AIDS-related complex with serological abnormalities*. Clin Exp Immunol, 1987. **67**(2): p. 236-44.
44. Jarvis, J.N., et al., *Rheumatoid factor expression and complement activation in children congenitally infected with human immunodeficiency virus*. Clin Immunol Immunopathol, 1993. **67**(1): p. 50-4.
45. Baldwin, W.M., 3rd, et al., *IgM immune complexes, lymphocytotoxins, and rheumatoid factors in renal transplant recipients with CMV disease*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 1985. **92**: p. 9-13.
46. Bonagura, V.R., et al., *Mapping IgG epitopes bound by rheumatoid factors from immunized controls identifies disease-specific rheumatoid factors produced by patients with rheumatoid arthritis*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2496-505.
47. Artandi, S.E., et al., *Molecular analysis of IgM rheumatoid factor binding to chimeric IgG*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 603-10.
48. Natvig, J.B., P.I. Gaarder, and M.W. Turner, *IgG antigens of the C gamma 2 and C gamma 3 homology regions interacting with rheumatoid factors*. Clin Exp Immunol, 1972. **12**(2): p. 177-84.
49. Williams, R.C., Jr. and C.C. Malone, *Rheumatoid-factor-reactive sites on CH2 established by analysis of overlapping peptides of primary sequence*. Scand J Immunol, 1994. **40**(4): p. 443-56.
50. Ercan, A., et al., *Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2239-48.
51. Jonsson, T., et al., *Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 1998. **18**(3): p. 119-22.
52. Mjaavatten, M.D., et al., *The likelihood of persistent arthritis increases with the level of anti-citrullinated peptide antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor: a longitudinal study of 376 patients with very early undifferentiated arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R76.
53. Masi, A.T., et al., *Prospective study of the early course of rheumatoid arthritis in young adults: comparison of patients with and without rheumatoid factor positivity at entry and*

- identification of variables correlating with outcome. Semin Arthritis Rheum, 1976. 4(4): p. 299-326.*
54. Pai, S., L. Pai, and R. Birkenfeldt, *Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol, 1998. 27(4): p. 252-6.*
  55. Scott, D.G., et al., *IgG rheumatoid factor, complement and immune complexes in rheumatoid synovitis and vasculitis: comparative and serial studies during cytotoxic therapy. Clin Exp Immunol, 1981. 43(1): p. 54-63.*
  56. Houssien, D.A., et al., *Rheumatoid factor isotypes, disease activity and the outcome of rheumatoid arthritis: comparative effects of different antigens. Scand J Rheumatol, 1998. 27(1): p. 46-53.*
  57. Westedt, M.L., et al., *Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis and vasculitis. Rheumatol Int, 1985. 5(5): p. 209-14.*
  58. Winchester, R.J., H.G. Kunkel, and V. Agnello, *Occurrence of -globulin complexes in serum and joint fluid of rheumatoid arthritis patients: use of monoclonal rheumatoid factors as reagents for their demonstration. J Exp Med, 1971. 134(3 Pt 2): p. 286s-295s.*
  59. Winchester, R.J., V. Agnello, and H.G. Kunkel, *Gamma globulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Partial characterization and relationship to lowered complement levels. Clin Exp Immunol, 1970. 6(5): p. 689-706.*
  60. Hannestad, K., *Presence of aggregated gamma-G-globulin in certain rheumatoid synovial effusions. Clin Exp Immunol, 1967. 2(4): p. 511-29.*
  61. Young, B.J., et al., *Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. Br Med J, 1979. 2(6182): p. 97-9.*
  62. Nienhuis, R.L. and E. Mandema, *A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. Ann Rheum Dis, 1964. 23: p. 302-5.*
  63. Sebbag, M., et al., *The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest, 1995. 95(6): p. 2672-9.*
  64. van Venrooij, W.J., J.J. van Beers, and G.J. Pruijn, *Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. Nat Rev Rheumatol, 2011. 7(7): p. 391-8.*
  65. van Venrooij, W.J. and G.J. Pruijn, *Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. Arthritis Res, 2000. 2(4): p. 249-51.*
  66. Makrygiannakis, D., et al., *Citrullination is an inflammation-dependent process. Ann Rheum Dis, 2006. 65(9): p. 1219-22.*
  67. Vossenaar, E.R., et al., *The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. Arthritis Rheum, 2004. 50(11): p. 3485-94.*
  68. van der Woude, D., et al., *Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. Ann Rheum Dis, 2010. 69(8): p. 1554-61.*
  69. Ioan-Facsinay, A., et al., *Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. Arthritis Rheum, 2008. 58(10): p. 3000-8.*
  70. Schuerwegh, A.J., et al., *Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(6): p. 2586-91.*
  71. Kokkonen, H., et al., *Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther, 2011. 13(1): p. R13.*

72. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes*. *Rheumatology (Oxford)*, 2001. **40**(2): p. 205-11.
73. Edwards, J.C., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
74. Cambridge, G., et al., *Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(8): p. 2146-54.
75. Trouw, L.A., et al., *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(7): p. 1923-31.
76. Clavel, C., et al., *Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(3): p. 678-88.
77. Makrygiannakis, D., et al., *Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(10): p. 1488-92.
78. Arend, W.P. and G.S. Firestein, *Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(10): p. 573-86.
79. James, E.A., et al., *HLA-DR1001 presents "altered-self" peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(10): p. 2909-18.
80. De Almeida, D.E., et al., *Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope*. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1927-34.
81. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
82. Westhovens, R., et al., *Long-term safety and efficacy of abatacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: a 7-year extended study*. *Clin Exp Rheumatol*, 2014. **32**(4): p. 553-62.
83. Panayi, G.S., V.M. Corrigall, and C. Pitzalis, *Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001. **27**(2): p. 317-34.
84. Panayi, G.S., *Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism?* *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(2): p. 58-9.
85. Schulze-Koops, H. and J.R. Kalden, *The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001. **15**(5): p. 677-91.
86. Lubberts, E., M.I. Koenders, and W.B. van den Berg, *The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(1): p. 29-37.
87. Liu, M.F., et al., *The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(1): p. 110-4.
88. Warrington, K.J., et al., *CD4+, CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(1): p. 13-20.
89. MacDonald, K.P., et al., *Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2404-14.
90. Shi, K., et al., *Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 650-5.

91. Wang, H., et al., *TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 632-7.
92. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
93. Youinou, P.Y., et al., *Specificity of plasma cells in the rheumatoid synovium. I. Immunoglobulin class of antiglobulin-producing cells*. Scand J Immunol, 1984. **20**(4): p. 307-15.
94. Snir, O., et al., *Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 44-52.
95. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 394-403.
96. Liew, F.Y. and I.B. McInnes, *The role of innate mediators in inflammatory response*. Mol Immunol, 2002. **38**(12-13): p. 887-90.
97. Haringman, J.J., et al., *Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(6): p. 834-8.
98. Cascao, R., et al., *Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(8): p. 531-5.
99. Armstrong, R.D. and G.S. Panayi, *Natural killer cell activity in inflammatory joint disease*. Clin Rheumatol, 1983. **2**(3): p. 243-9.
100. Turesson, C., et al., *Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(8): p. 722-7.
101. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
102. Neogi, T., et al., *The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2582-91.
103. Smolen, J.S., et al., *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 964-75.
104. Thalayasingam, N. and J.D. Isaacs, *Anti-TNF therapy*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2011. **25**(4): p. 549-67.
105. Chan, A.C. and P.J. Carter, *Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 301-16.
106. *OMERACT, Conference on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. Proceedings. Maastricht, The Netherlands, April 29-May 3, 1992*. J Rheumatol, 1993. **20**(3): p. 527-91.
107. *Reduced joint counts in rheumatoid arthritis clinical trials. American College of Rheumatology Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(4): p. 463-4.
108. Langley, G.B. and H. Sheppard, *Problems associated with pain measurement in arthritis: comparison of the visual analogue and verbal rating scales*. Clin Exp Rheumatol, 1984. **2**(3): p. 231-4.
109. Anderson, J.J. and M.C. Chernoff, *Sensitivity to change of rheumatoid arthritis clinical trial outcome measures*. J Rheumatol, 1993. **20**(3): p. 535-7.

110. Buchbinder, R., et al., *Which outcome measures should be used in rheumatoid arthritis clinical trials? Clinical and quality-of-life measures' responsiveness to treatment in a randomized controlled trial.* Arthritis Rheum, 1995. **38**(11): p. 1568-80.
111. Paulus, H.E., et al., *Equivalence of the acute phase reactants C-reactive protein, plasma viscosity, and Westergren erythrocyte sedimentation rate when used to calculate American College of Rheumatology 20% improvement criteria or the Disease Activity Score in patients with early rheumatoid arthritis.* Western Consortium of Practicing Rheumatologists. J Rheumatol, 1999. **26**(11): p. 2324-31.
112. Dawes, P.T., et al., *Rheumatoid arthritis: treatment which controls the C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate reduces radiological progression.* Br J Rheumatol, 1986. **25**(1): p. 44-9.
113. van Leeuwen, M.A., et al., *Individual relationship between progression of radiological damage and the acute phase response in early rheumatoid arthritis. Towards development of a decision support system.* J Rheumatol, 1997. **24**(1): p. 20-7.
114. Prevoo, M.L., et al., *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 44-8.
115. Aletaha, D. and J.S. Smolen, *The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases.* Rheum Dis Clin North Am, 2006. **32**(1): p. 9-44, vii.
116. Smolen, J.S., et al., *A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice.* Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(2): p. 244-57.
117. Aletaha, D. and J. Smolen, *The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis.* Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(5 Suppl 39): p. S100-8.
118. Aletaha, D., et al., *Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2625-36.
119. van Riel, P.L. and A.M. van Gestel, *Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2000. **59** Suppl 1: p. i28-31.
120. van der Heijde, D., *How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method.* J Rheumatol, 2000. **27**(1): p. 261-3.
121. van der Heijde, D.M., *Radiographic imaging: the 'gold standard' for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2000. **39** Suppl 1: p. 9-16.
122. Naredo, E., et al., *Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography.* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(3): p. 375-81.
123. Wakefield, R.J., et al., *Should oligoarthritis be reclassified? Ultrasound reveals a high prevalence of subclinical disease.* Ann Rheum Dis, 2004. **63**(4): p. 382-5.
124. Dougados, M., et al., *The ability of synovitis to predict structural damage in rheumatoid arthritis: a comparative study between clinical examination and ultrasound.* Ann Rheum Dis, 2013. **72**(5): p. 665-71.
125. van Schouwenburg, P.A., T. Rispens, and G.J. Wolbink, *Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis.* Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(3): p. 164-72.
126. van Schouwenburg, P.A., et al., *Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation.* Ann Rheum Dis, 2013. **72**(1): p. 104-9.

127. Pascual-Salcedo, D., et al., *Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2011. **50**(8): p. 1445-52.
128. Finckh, A., et al., *Influence of anti-infliximab antibodies and residual infliximab concentrations on the occurrence of acquired drug resistance to infliximab in rheumatoid arthritis patients*. *Joint Bone Spine*, 2010. **77**(4): p. 313-8.
129. Maini, R.N., et al., *Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(9): p. 1552-63.
130. Haraoui, B., et al., *Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response*. *J Rheumatol*, 2006. **33**(1): p. 31-6.
131. Bendtzen, K., et al., *Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(12): p. 3782-9.
132. Wolbink, G.J., et al., *Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(3): p. 711-5.
133. van den Bemt, B.J., et al., *Sustained effect after lowering high-dose infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a prospective dose titration study*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(12): p. 1697-701.
134. Radstake, T.R., et al., *Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(11): p. 1739-45.
135. Bartelds, G.M., et al., *Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(5): p. 817-21.
136. van de Putte, L.B., et al., *Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(5): p. 508-16.
137. Keystone, E.C., et al., *Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(5): p. 1400-11.
138. Weinblatt, M.E., et al., *Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(1): p. 35-45.
139. Choy, E., et al., *Certolizumab pegol plus MTX administered every 4 weeks is effective in patients with RA who are partial responders to MTX*. *Rheumatology (Oxford)*, 2012. **51**(7): p. 1226-34.
140. Fleischmann, R., et al., *Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(6): p. 805-11.
141. Smolen, J., et al., *Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(6): p. 797-804.
142. Keystone, E., et al., *Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week,*

- phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. Arthritis Rheum, 2008. 58(11): p. 3319-29.*
143. Tanaka, Y., et al., *Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. Ann Rheum Dis, 2012. 71(6): p. 817-24.*
  144. Weinblatt, M.E., et al., *Intravenous golimumab is effective in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy with responses as early as week 2: results of the phase 3, randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled GO-FURTHER trial. Ann Rheum Dis, 2013. 72(3): p. 381-9.*
  145. Smolen, J.S., et al., *Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. Lancet, 2009. 374(9685): p. 210-21.*
  146. Kay, J., et al., *Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. Arthritis Rheum, 2008. 58(4): p. 964-75.*
  147. Keystone, E.C., et al., *Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor {alpha} given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. Ann Rheum Dis, 2009. 68(6): p. 789-96.*
  148. Emery, P., et al., *Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naive patients with active rheumatoid arthritis: twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2009. 60(8): p. 2272-83.*
  149. Kremer, J., et al., *Golimumab, a new human anti-tumor necrosis factor alpha antibody, administered intravenously in patients with active rheumatoid arthritis: Forty-eight-week efficacy and safety results of a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled study. Arthritis Rheum, 2010. 62(4): p. 917-28.*
  150. Klareskog, L., et al., *Assessment of long-term safety and efficacy of etanercept in a 5-year extension study in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol, 2011. 29(2): p. 238-47.*
  151. Jamnitski, A., et al., *Patients non-responding to etanercept obtain lower etanercept concentrations compared with responding patients. Ann Rheum Dis, 2012. 71(1): p. 88-91.*
  152. Hoshino, M., et al., *Influence of antibodies against infliximab and etanercept on the treatment effectiveness of these agents in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol, 2012. 22(4): p. 532-40.*
  153. Keystone, E.C., et al., *Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum, 2004. 50(2): p. 353-63.*
  154. Dore, R.K., et al., *The immunogenicity, safety, and efficacy of etanercept liquid administered once weekly in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol, 2007. 25(1): p. 40-6.*
  155. Garces, S., J. Demengeot, and E. Benito-Garcia, *The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. Ann Rheum Dis, 2013. 72(12): p. 1947-55.*

156. Vincent, F.B., et al., *Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective.* Ann Rheum Dis, 2013. **72**(2): p. 165-78.
157. Krieckaert, C., T. Rispens, and G. Wolbink, *Immunogenicity of biological therapeutics: from assay to patient.* Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(3): p. 306-11.
158. Hart, M.H., et al., *Differential effect of drug interference in immunogenicity assays.* J Immunol Methods, 2011. **372**(1-2): p. 196-203.
159. van Schouwenburg, P.A., et al., *A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals "hidden" immunogenicity in rheumatoid arthritis patients.* J Immunol Methods, 2010. **362**(1-2): p. 82-8.
160. Aarden, L., S.R. Ruuls, and G. Wolbink, *Immunogenicity of anti-tumor necrosis factor antibodies-toward improved methods of anti-antibody measurement.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 431-5.
161. Alessandri, C., et al., *Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement.* Ann Rheum Dis, 2004. **63**(10): p. 1218-21.
162. Atzeni, F., et al., *Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(1): p. R3.
163. De Rycke, L., et al., *Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 299-302.
164. Bobbio-Pallavicini, F., et al., *Predictive value of antibodies to citrullinated peptides and rheumatoid factors in anti-TNF-alpha treated patients.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1109**: p. 287-95.
165. Braun-Moscovici, Y., et al., *Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 2006. **33**(3): p. 497-500.
166. Nicaise Roland, P., et al., *Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy.* Arthritis Res Ther, 2008. **10**(6): p. R142.
167. Dejaco, C., et al., *Third generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies do not predict anti-TNF-alpha treatment response in rheumatoid arthritis.* Rheumatol Int, 2010. **30**(4): p. 451-4.
168. Klaasen, R., et al., *The value of rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies as predictors of response to infliximab in rheumatoid arthritis: an exploratory study.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(8): p. 1487-93.
169. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
170. Atzeni, F., et al., *Switching rheumatoid arthritis treatments: an update.* Autoimmun Rev, 2011. **10**(7): p. 397-403.
171. Yanai, H. and S.B. Hanauer, *Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD.* Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 685-98.
172. St Clair, E.W., et al., *The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Arthritis Rheum, 2002. **46**(6): p. 1451-9.

173. Maese, J., et al., *Management of rheumatoid arthritis in Spain (emAR II). Clinical characteristics of the patients.* Reumatol Clin, 2012. **8**(5): p. 236-42.
174. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
175. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.* Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
176. Matsumoto, M., et al., *Lymphotoxin-alpha-deficient and TNF receptor-1-deficient mice define developmental and functional characteristics of germinal centers.* Immunol Rev, 1997. **156**: p. 137-44.
177. Pasparakis, M., et al., *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
178. Fu, Y.X., et al., *B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion.* J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1009-18.
179. Boussiotis, V.A., et al., *Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7007-11.
180. Duddy, M.E., A. Alter, and A. Bar-Or, *Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?* J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3422-7.
181. Anolik, J.H., et al., *Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks.* J Immunol, 2008. **180**(2): p. 688-92.